



Facultad de Ciencias

Departamento de Química Orgánica

Síntesis de Sistemas Poliazaheterocíclicos y sus Complejos Luminiscentes de Lantanidos en Marcaje de Oligonucleótidos, como Sondas Luminiscentes y para la Preparación de Materiales Metalorgánicos (MOFs).

Memoria para optar al Título de Doctor en Ciencias Químicas

Arturo Gamonal Ruiz-Crespo

Madrid, Noviembre de 2015

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad Autónoma de Madrid, durante los años 2011-2015, y ha sido financiada de forma conjunta por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid y el Séptimo programa Marco de la UE, dentro del proyecto ACUSEP, Grant nº 259848, a quienes deseo expresar mis agradecimientos.

Después de los formalismos impuestos, en primer lugar quiero expresar mi más sinceros agradecimientos a Juan Carlos Rodríguez Ubis, mi tutor durante esta tesis doctoral, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por compartir sus ideas, su experiencia y haber guiado este trabajo hasta el final, con una paciencia infinita, brindándome su apoyo, ayuda y confianza. También quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Olga Juanes Recio y al Prof. Ernesto Brunet por su apoyo y consejos durante estos años.

Quiero hacer una mención especial a Saara Wittfooth, Tero Soukka, Minna Soikkeli, Ari Lehmusvuori y Ulla Karhunen, entre otros, por haberme acogido y guiado en la aventura de la bioquímica durante mi estancia en el departamento de Biotecnología de Universidad de Turku.

Nunca me ha resultado fácil la escritura y esta tarea no ha sido una excepción. Ahora que todo ha terminado no puedo dejar de recordar a las muchas personas que a lo largo de estos años me han ayudado de una forma u otra, y que han contribuido con su granito de arena para que termine presentando este trabajo.

La primera de la que me acuerdo después de este largo camino agri dulce de la investigación en las instituciones públicas, es Paloma Martínez a la que agradezco su apoyo y consejo durante mis años en UCM, además de darme la oportunidad de iniciarme en el trabajo del laboratorio.

He sido muy afortunado por la cantidad de amig@s y compañer@s con los que he compartido mucho. No tengo palabras para agradecer todo su apoyo a esa segunda familia que son mis colegas de Manjatan, que me han demostrado cosas que pocos han demostrado, esto va por vosotr@s, Ame, Arra, Barros, Barquin (mi hermano ciclista), Chiti (mi bro!) , Chus, Jaehan Cho, Jose, Loreta, Marini, Napi, Naranjo, Pilu, Roncho, Sarotix, Toro, Yayo y al Vasko!! y una larga lista de puntos suspensivos. También tengo que agradecer infinitamente por su apoyo compañía, risas y penas a otr@s tant@s que llevo en el corazón, Ester, Noe, Tomás, Ainoa, Maria, Jose, Martiña, Sofia, Nerea, Bea, Mariu... y una lista interminable de gente de la UCM.

A la gente de Crisol, que pese a ser de la UCM, compartí mucho más tiempo fuera que dentro de la universidad, Isato, Carol, Nathali, Mayte, Popi, Chicho, y especialmente a Police, que pese a no estar presente siempre estuvo ahí.

A Paula, que no se si incluirla con los de la uni, el pueblo..., pero es que tienes un hueco para ti sola, ya que hemos compartido infinitos momentos, buenos y malos, y los que quedan por compartir.

Y como no, a mi gente de la UAM, a otr@s tant@s, compañer@s de piscina, comidas, cotilleos... Abraham, Cinthya, Irene, Laura, Edu, Laurita, Maria, Iri que al final hemos pasado media tesis juntos, a Elena que me ha aguantado alegrías, penas, sueños y pesadillas todas las mañanas café en mano, que hubiese hecho sin ti, y a mi becaria favorita, la única persona que me ha hecho caso en el labo, Paloma. Y a vosotras que os conocí en la UAM y pasasteis a ser parte de mi vida Mariam y Emilie, que aunque no os tenga cerca físicamente siempre estáis ahí para todo.

Por último, a mi Familia, mis herman@s mi padre y a la madre que me parió que me habéis dado todo sin pedir nada a cambio, quien iba a decir que quería dejar de estudiar hace años y ahora parece que no me quiero despegar de la universidad. Y como no se lo voy a agradecer a mi confidente canino, al que nunca se ha quejado de nada, y que siempre está dispuesto a salir conmigo, a mi perro Otto!!

Esta tesis y como se ha desarrollado debe todo a quienes, se quedaron mucho o poco tiempo en mi vida, y a los que llegaron a ella y después se marcharon. Su amor, así como su odio han hecho que mi vida valga la pena. Y como dicen los Maniaticos, "Pero que no sea el último paso".

Madrid, Noviembre 2015

Arturo Gamonal.

Contenido

1.	Antecedentes e Introducción	7
1.1.	Prefacio	8
1.2.	Luminiscencia de los Iones Lantánidos	10
1.3.	Luminiscencia en los complejos lantánidos (efecto antena)	13
1.4.	Diseño de Sondas Luminiscentes.....	19
1.4.1.	Síntesis de compuestos derivados del 1-bpp	20
1.4.2.	Síntesis de compuestos derivados del Bisindazolilpiridina (1-bip) y de inzolilpirazolilpiridina (1-ipp).....	26
1.5.	Complejos luminiscentes de ligandos derivados de 1-bpp y 1-bip.	30
1.6.	Materiales derivados de bispirazolilpiridinas	39
1.7.	Aplicaciones de sondas luminiscentes en el marcaje de oligonucleótidos	30
1.7.1.	Aspectos generales de la conjugación de Oligonucleótidos para su aplicación médica	30
2.	Objetivos.....	43
I.	Desarrollo de una nueva metodología sintética para la obtención de ligandos antena basados en esqueletos heterocíclicos y su aplicación como sondas luminiscentes en la detección de ADN bacteriano.....	45
II.	La síntesis de nuevos ligandos tetracarboxílicos y el estudio de las propiedades fotofísicas de sus complejos con iones lantánidos.	50
III.	Preparación de estructuras poliheterocíclicas de piridina, pirazol e indazol funcionalizadas con grupos ácido carboxílico para la preparación de materiales híbridos luminiscentes (MOF's).....	51
3.	Desarrollo de una nueva metodología sintética para la obtención de ligandos antena basados en esqueletos heterocíclicos y su aplicación como sondas luminiscentes en la detección de ADN bacteriano.	53
3.1.	Síntesis	57
3.1.1.	Síntesis de Ligandos asimétricos derivados del 1-bpp, para su uso como sondas luminiscentes.	57
3.1.2.	Síntesis de los Ligandos derivados del 1-ipp.....	67
3.2.	Estudio fotofísico de los ligandos antena	76

3.2.1	Ligandos derivados de bispirazolipiridina	79
3.2.2	Ligandos derivados de indazolipirazolipiridinas (ipp).	85
3.3	Conjugación, Hibridación y Aplicación.....	102
	Puesta a punto del método	103
	Reacciones de conjugación.....	104
	Luminiscencia en las reacciones de hibridación.....	111
4.	Ligandos derivados del ácido iminodiacético y propiedades luminiscentes de sus complejos con lantánidos.....	121
4.1.	Síntesis de ligandos derivados del ácido iminodiacético.....	124
4.1.1.	Síntesis de los ligandos derivados de bispirazolipiridina.	124
4.1.2.	Síntesis de los ligandos derivados de bisindazolipiridina nonadentados .	130
4.2.	Estudio fotofísico de ligandos nonadentados.....	134
5.	Diseño y estudio de nuevos materiales moleculares luminiscentes.....	149
5.1.	Síntesis de unidades estructurales	152
5.1.1.	Preparación de los precursores derivados de 2,4,6-trispirazolipiridina (1-ttp) y 2,4,6-trisindazolipiridina (1-tip).	153
1.1.1.	Preparación de los precursores derivados de 1-bpp y 1-bpp	157
5.2.	Estudio morfológico y estructural de los geles.....	162
5.2.1.	Estudio del gel del compuesto 27-4.	164
5.2.2.	Estudio del gel del compuesto 27-3.	168
5.2.3.	Estudio del gel del compuesto 31-4	170
5.3.	Diseño y Síntesis de MOFs	173
5.3.1.	Elección de ligandos orgánicos y métodos.	173
6.	Conclusiones.....	185
6.1.	Conclusiones del capítulo 3	186
6.1.	Conclusiones del capítulo 4	187
6.3.	Capítulo 5	188
7.	Parte experimental.....	189
7.2.	Síntesis de los ligandos	192

1. Antecedentes e Introducción

“En nuestra sociedad el gozo de la creación es un lujo reservado
a unos pocos afortunados: los artistas, los artesanos y los científicos”

Noam Chomsky

1.1. Prefacio

Pocos fenómenos han atraído tanto la mirada de filósofos y científicos, y han poblado los sueños de pensadores y poetas como la luz, la luminiscencia.

Desde antiguo, son considerables las referencias escritas que demuestran que el fenómeno de la luminiscencia no es algo nuevo. Desde Shih Ching en China, pasando por el famoso filósofo griego Aristóteles, incluyendo las antiguas leyendas de los marinos que hablaban de un mar brillante en la noche, se narran cantidad de historias sobre este fenómeno que despertaban curiosidad, supersticiones y miedos.

El médico español Nicolás Monarde, en 1565, fue el primer autor en describir lo que más tarde Stokes¹ (1852) denominaría fluorescencia. A principios del siglo XVII Cascariolo acuñó el término de fosforescentes para las sustancias con la propiedad de brillar durante largo tiempo después de ser excitadas. Poco tiempo después apareció la primera monografía sobre la luminiscencia escrita por Liceti,² aunque no sería hasta 1888 cuando el químico alemán Eilhard Wiedemann introdujo el término *luminiscencia* para abarcar ambos fenómenos, fluorescencia y fosforescencia.

La luminiscencia ha sido fundamental en el descubrimiento de varios elementos lantánidos³. A su vez, la luminiscencia de los compuestos de lantánidos ha fascinado a los investigadores durante décadas gracias a sus propiedades, como una estrecha banda de emisión, lo cual se traduce en una luz característica de alta pureza para cada ion. Esta emisión depende del ion y es independiente del entorno del ion lantánido.

Hoy en día, los complejos de lantánidos luminiscentes tienen muchas aplicaciones tanto tecnológicas, como químicas y médicas,⁴ podemos encontrarlos en aparatos de iluminación (lámparas de bajo consumo y OLED's)⁵, pantallas de ordenador y de televisión o fibras ópticas para telecomunicaciones.⁶ Hoy en día, los complejos de iones

¹ G. G. Stokes, *Phil. Trans. R. Soc. London*, **1852**, 142, 463.

² I. B. Berlman, "*Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*" p. 2, Academic Press, New York, **1965**.

³ W. Crookes, *Philos. Trans. R. Soc. London*, Ser. A, **1885**, 176, 691.; G. Urbain, *Ann. Chim. Phys.*, Ser. 8, **1909**, 18, 222.

⁴ J.-C. G. Bünzli, in *Spectroscopic Properties of Rare Earths in Optical Materials*, eds. G. K. Liu and B. Jacquier, Springer Verlag, Berlin, **2005**, Vol. 83, Ch. 11.

⁵ S. Shionoya and W. M. Yen, *Phosphor Handbook*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 33431, USA, **1999**.

⁶ J. Kido and Y. Okamoto, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 2357.

lantánidos tienen un papel imprescindible en el campo de la bio-medicina⁷ y diagnosis, donde se emplean para mejorar las imágenes en diversas técnicas (Imagen por Resonancia Magnética o Imagen Óptica),⁸ como en radioterapia,⁹ así como es marcadores luminiscentes en bioensayos^{10,11} y en materiales de contraste para estudios biomédicos.¹²

Dentro de su empleo como sondas luminiscentes para biodiagnósticos, en este trabajo se aborda la síntesis de ligandos poliheterocíclicos, derivados de la piridina, con el objetivo de estudiar las propiedades luminiscentes de los complejos formados con iones lantánidos, Eu y Tb principalmente. El uso de este tipo de ligandos como marcadores luminiscentes destaca en el campo diagnóstico clínico. Paralelamente, se abordará la síntesis de otra familia de ligandos poliheterocíclicos con grupos fuertemente quelantes cuyo objetivo será aislar al ion lantánido del medio.

Además, se describirá el uso de algunos de los ligandos poliheterocíclicos sintetizados como interruptores luminiscentes, y de manera más específica, se describirá su aplicación en la determinación de ADN bacteriano.

⁷A. Picot, F. Malvoti, B. LeGuennic, P.L. Baldeck, J.A.G. Williams, C. Andraud, O. Maury. *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 2659.

⁸ T. Ueno, Y. Urano, K. Setsukinai, H. Takakusa, H. Kojima, K. Kikuchi, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, T. Nagano. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14079.

⁹ T. Yogo, Y. Urano, Y. Ishitsuka, F. Maniwa, T. Nagano. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12162.

¹⁰ K. Matsumoto and J. G. Yuan, *Lanthanide Chelates as Fluorescent Labels for Diagnostics and Biotechnology, Metal Ions in Biological Systems*, eds. A. Sigel and H. Sigel, Vol. 40, Ch. 6, Marcel Dekker Inc., New York, **2003**.

¹¹ S. Faulkner and J. L. Matthews, in *Comprehensive Coordination Chemistry II*, ed. M. D. Ward, Elsevier Pergamon, Amsterdam, **2004**, Vol. 9, Ch. 9.21, 913–44; (b) V.W.W. Yam and K. K. W. Lo, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 184, 157.

¹² S. Faulkner, S. J. A. Pope and B. P. Burton-Pye, *Appl. Spectrosc. Rev.*, **2005**, 40, 1.

1.2. Luminiscencia de los Iones Lantánidos

Los lantánidos constituyen el primer grupo de elementos de transición interna del sistema periódico, comprendiendo los quince elementos desde el Lantano ($Z = 57$) hasta el Lutecio ($Z = 71$). Aunque originalmente se los denominó “tierras raras”, debido a que resistieron durante mucho tiempo la extracción de sus menas oxidadas, en realidad no se trata de elementos raros ya que su abundancia en la litosfera es relativamente elevada, comparable a la de plata y estaño.

El comportamiento químico de todos los lantánidos es muy similar. Su química está asociada a su estado de oxidación más importante y estable en disolución acuosa, el trivalente (Ln^{3+}), aunque también presentan +2 y +4.

Nº atómico	Nombre	Símbolo	Configuración Ln^{3+}	Estado fundamental Ln^{3+}
57	Lantano	La	[Xe]	$^1\text{S}_0$
58	Cerio	Ce	[Xe]4f ¹	$^2\text{F}_{5/2}$
59	Praseodimio	Pr	[Xe]4f ²	$^3\text{H}_4$
60	Neodimio	Nd	[Xe]4f ³	$^4\text{I}_{9/2}$
61	Prometio	Pm	[Xe]4f ⁴	$^5\text{I}_4$
62	Samario	Sm	[Xe]4f ⁵	$^6\text{H}_{5/2}$
63	Europio	Eu	[Xe]4f ⁶	$^7\text{F}_0$
64	Gadolinio	Gd	[Xe]4f ⁷	$^8\text{S}_{7/2}$
65	Terbio	Tb	[Xe]4f ⁸	$^7\text{F}_6$
66	Disprosio	Dy	[Xe]4f ⁹	$^6\text{H}_{15/2}$
67	Holmio	Ho	[Xe]4f ¹⁰	$^5\text{I}_8$
68	Erbio	Er	[Xe]4f ¹¹	$^4\text{I}_{15/2}$
69	Tulio	Tm	[Xe]4f ¹²	$^3\text{H}_6$
70	Iterbio	Yb	[Xe]4f ¹³	$^2\text{F}_{7/2}$
71	Lutecio	Lu	[Xe]4f ¹⁴	$^1\text{S}_0$

Tabla 1.1 Estructura electrónica de los iones lantánidos trivalentes.

Los iones lantánidos trivalentes (Ln^{3+}) se caracterizan por el llenado gradual de los orbitales 4f, desde el 4f⁰ (La^{3+}) al 4f¹⁴ (Lu^{3+}) (Tabla 1.1). Son las transiciones electrónicas f-f dentro de la capa 4fⁿ, protegida de su entorno por las capas 5s² y 5p⁶, las que les confieren a los Lantanidos sus propiedades luminiscentes, como son las emisiones de banda estrecha y los elevados tiempos de vida de los estados excitados.

Sus propiedades de emisión dependen de la facilidad con la que cada estado o estados excitados pueden ser poblados y de los correspondientes caminos seguidos para la desactivación no radiativa. Cuanto menor sea la diferencia energética entre el nivel excitado de menor energía del ion metálico y el del estado fundamental, más fácil resultará la desactivación por procesos no radiativos, como por ejemplo a través de vibraciones de los ligandos, en especial, de vibraciones de alta energía, tales como las O-H. En la Figura 1.1 se muestra un diagrama parcial de las energías de los distintos niveles para los iones lantánidos en medio acuoso,¹³ mientras que las principales transiciones luminiscentes se muestran en la Tabla 1.2.¹⁴

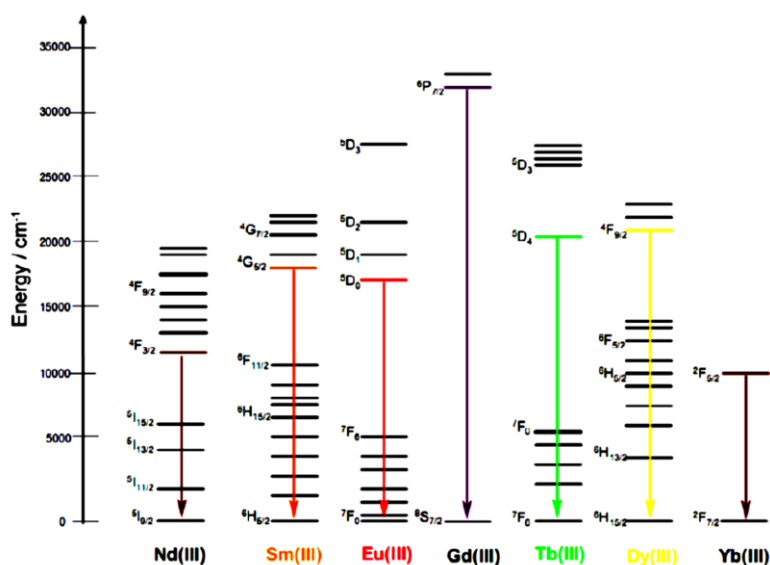


Figura 1.1 Niveles de energía de los Lantanidos (Nd,Sm,Eu,Gd,Tb, Dy, Yb)

Los iones Eu^{3+} , Gd^{3+} y Tb^{3+} muestran las mayores diferencias energéticas entre el nivel excitado de menor energía del ion metálico y el estado fundamental ($\Delta E = 12.300$, 32.200 y 14.800 cm^{-1} , respectivamente). Sin embargo, la energía del nivel excitado de menor energía del ion Gd^{3+} es tan alta que resulta difícil de poblar y no presenta luminiscencia, por lo que no es de mucha utilidad como sonda luminiscente para bioanálisis. Por ello, habitualmente se utilizan iones de Eu^{3+} y Tb^{3+} , como sondas luminiscentes, pues emiten en la región espectral del visible, tienen una diferencia energética (entre el nivel excitado y el nivel del estado fundamental) apropiada y presentan tiempos de vida media del estado excitado largos.

¹³ W. T. Carnall, In *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths* vol. 3; K. A. Gschneidner, J.-C. G. Bünzli, V. K. Pecharsky, Eds.; North Holland Publ. Co.: Amsterdam, **1979**, 171.

¹⁴ W. T. Carnall, P. R. Fields, K. Rajnak, *J. Chem. Phys.* **1968**, 49, 4424.

	Transición	λ Emisión (nm)	Intensidad Relativa
Europio	$^5D_1 \rightarrow ^7F_0$	526	débil
	$^5D_1 \rightarrow ^7F_1$	537	débil
	$^5D_1 \rightarrow ^7F_2$	558-560	débil
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_0$	578-580	débil
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_1$	585-600	intensa
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_2$	610-630	muy intensa
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_3$	645-660	débil
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_4$	680-705	media
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_5$	710	Débil
Terbio	$^5D_4 \rightarrow ^7F_6$	485-500	Media
	$^5D_4 \rightarrow ^7F_5$	540-555	muy intensa
	$^5D_4 \rightarrow ^7F_4$	580-595	media
	$^5D_4 \rightarrow ^7F_3$	615-625	media-débil
	$^5D_4 \rightarrow ^7F_2$	645-655	débil

Tabla 1.2. Longitudes de onda de las transiciones luminiscentes de los iones de Eu y Tb.

Aunque la fotoluminiscencia de los iones lantánidos puede ser un proceso eficiente, todos los iones lantánidos tienen débil absorción de la luz, ya que las transiciones $f \rightarrow f$ están prohibidas por las reglas de selección de Laporte y presentan coeficientes de extinción molar (ϵ) muy bajos, menores a $10 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.^{15,16} Esto se traduce en que sólo una cantidad muy limitada de radiación es absorbida por excitación directa de los niveles $4f$, y se requieren fuentes intensas de luz, tales como los láseres, para poblar los estados excitados de los iones Ln^{3+} mediante excitación directa.

¹⁵ M. H. Werts, *Sci Prog.* **2005**, *88*, 101.

¹⁶ J.-C. G. Bünzli, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 53.

1.3. Luminiscencia en los complejos lantánidos (efecto antena)

Sin embargo, el problema de la débil absorción de luz, de los iones lantánidos, puede ser solucionado por el denominado efecto de antena, en el que un ligando orgánico (también denominado antena o sensibilizador) se coordina al ion lantánido e induce su emisión luminiscente, mediante una excitación indirecta (Figura 1.2).

No fue hasta 1942, cuando Weissman observó que al irradiar con luz ultravioleta a unos complejos de europio con diferentes cromóforos orgánicos, la intensidad de la luminiscencia era mayor que la de los complejos análogos sin las moléculas orgánicas o “antenas”.¹⁷ Los cromóforos orgánicos presentan intensas bandas de absorción, gracias a las cuales mucha más luz puede ser absorbida por los ligandos orgánicos que el ion lantánido por sí mismo. Aunque no fue hasta la década de los sesenta cuando, la importancia de la obra de Weissman fuera reconocida, se estudiaron los mecanismos de la transferencia de energía desde el ligando orgánico al ion lantánido. Desde entonces la química de coordinación de los lantánidos ha experimentado un enorme desarrollo.

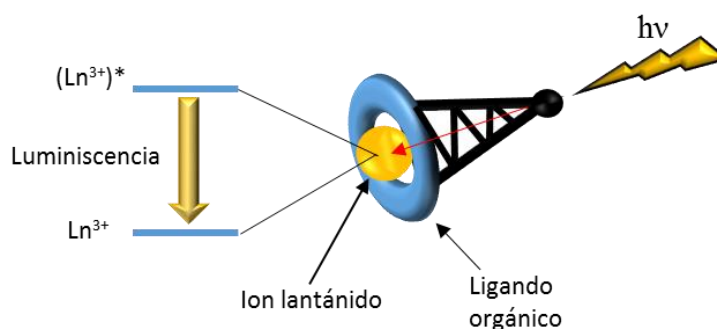


Figura 1.2. Efecto antena.

El mecanismo, comúnmente aceptado, de la transferencia de energía desde los ligandos orgánicos hacia el ion lantánido fue propuesto por Crosby y Whan (Figura 1.3).¹⁸ Tras la excitación con radiación ultravioleta, los ligandos orgánicos del complejo de lantánido son excitados desde el estado fundamental (S_0) a los niveles de vibracionales del primer estado excitado (S_1). El estado singlete excitado puede desactivarse radiativamente al estado fundamental (fluorescencia molecular, $S_1 \rightarrow S_0$), o puede sufrir cruce entre sistemas no radiante desde el estado singlete S_1 al estado triplete T_1 . El estado triplete (T_1) puede desactivarse radiativamente al estado fundamental, S_0 , mediante la

¹⁷ S. I. Weissman, *J. Chem. Phys.* **1942**, 10, 214.

¹⁸ (a) R.E. Whan, G. A. Crosby. *J. Mol. Spectrosc.* **1962**, 8, 315.(b) G. A. Crosby, R. E. Whan, R. M. Alire, *J. Chem. Phys.* **1961**, 34,743.(c) G.A. Crosby, R.E. Whan, J.J. Freeman. *J. Phys. Chem.* **1962**, 66, 2493.

transición de spin prohibida T_1-S_0 , el resultado de esto es la fosforescencia molecular. Alternativamente, el complejo puede sufrir una transición no radiativa desde el estado triplete a un estado excitado del ion mediante una transferencia de energía. La transición radiativa desde el estado excitado del ion lantánido a su nivel fundamental da lugar a la emisión de luz (luminiscencia).

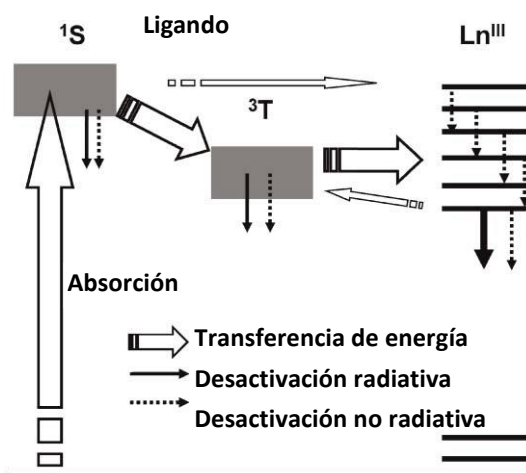


Figura 1.3. Procesos fotoquímicos en el diagrama de Jablonski

Paralelamente a esta emisión se produce una desactivación no radiativa. De acuerdo con lo postulado por Crosby y Whan, la mayor causa de esta desactivación se debe a la cesión de energía hacia los niveles vibracionales de ciertos enlaces, principalmente los de las moléculas de agua y otros disolventes.^{18a}

La luminiscencia del ion lantánido sólo es posible desde ciertos niveles, que se denominan niveles de resonancia. Los principales niveles de resonancia son $^4G_{5/2}$ para Sm^{3+} ($17\,800\text{ cm}^{-1}$), 5D_0 para Eu^{3+} ($17\,250\text{ cm}^{-1}$), 5D_4 para Tb^{3+} ($20\,430\text{ cm}^{-1}$), y $^4F_{9/2}$ para Dy^{3+} ($20\,960\text{ cm}^{-1}$). Si el ion lantánido es excitado a un nivel no emisor, ya sea de forma directa por la excitación en los niveles 4f o de forma indirecta por transferencia de energía, la energía de excitación se disipa mediante de procesos no radiativos hasta que se alcanza un nivel de resonancia.

Para conseguir una intensidad de óptima luminiscencia del lantánido, los procesos de fluorescencia molecular, fosforescencia molecular y las desexcitaciones no radiativas se han de minimizar, y tanto el cruce entre sistemas como las transferencia de energía entre el ligando y el ion lantánido han de ser muy eficaces.

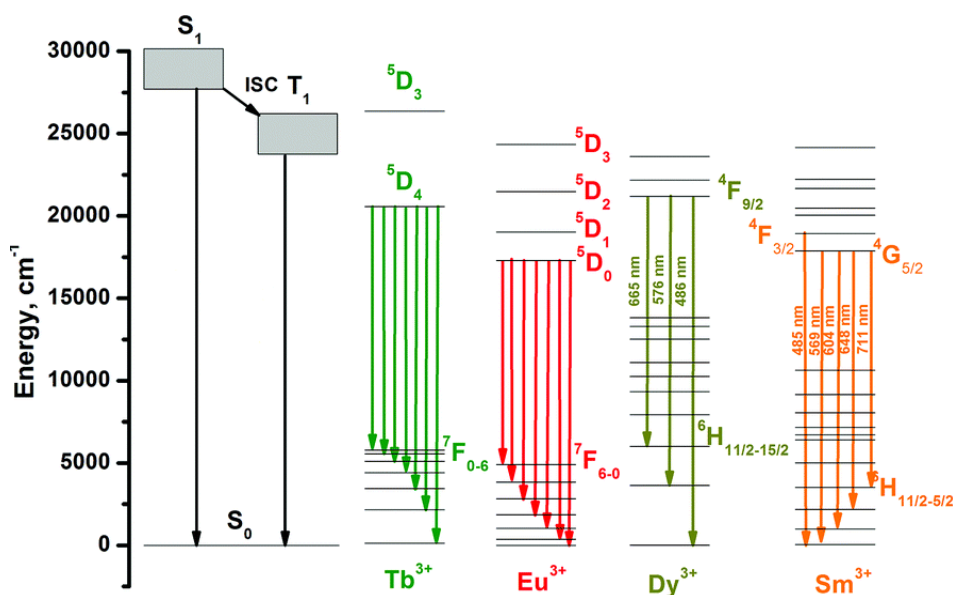


Figura 1.4. Diagrama de Jablonski para la sensibilización del ion lantánido por el ligando antena.

Otro factor a tener en cuenta a la hora de poblar el nivel de resonancia de un ion lantánido, es que es necesario que el estado triplete de más baja energía del complejo se encuentre a un nivel igual o mayor que el nivel de resonancia del ion lantánido. Si los niveles de energía de los ligandos orgánicos son menores al nivel de resonancia del ion lantánido, o bien, se observa la fluorescencia o fosforescencia molecular del ligando, o no se observa emisión de luz en absoluto.

Por tanto, la luminiscencia observada para un complejo de lantánido depende entre otros factores de la diferencia entre el nivel de triplete más bajo del ligando y el nivel de resonancia del ion lantánido. Debido a que la posición del nivel de triplete depende del tipo de ligando es posible controlar la intensidad de la luminiscencia observada para un ion lantánido variando la estructura del ligando.¹⁹ Otro factor que afecta a la luminiscencia es la temperatura, por lo que la luminiscencia causada por la excitación indirecta a través de ligandos orgánicos es mucho más sensible a la temperatura que la luminiscencia causada por la excitación directa de los niveles de 4f.

Los estudios fotofísicos para calcular la eficiencia de la transferencia de energía entre el estado triplete del ligando y el ion lantánido y la diferencia de energía entre el triplete y los niveles de resonancia de los iones lantánidos, se realizan sobre complejos de Gadolinio.²⁰ Para determinar la energía de los estados triplete se han de medir los espectros de fosforescencia de Gadolinio, ya que los niveles 4f del Gadolinio están localizados a mayor energía que el nivel triplete del ligando, por lo que no se observa

¹⁹ N. Filipescu, W.F. Sager, F.A. Serafin. *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 3324.

²⁰ S. Sato, M. Wada; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1970**, *43*, 1955.

emisión del metal. Para evitar la desactivación mediante procesos no radiativos, las medidas se realizan a temperaturas criogénicas. A 77K la desactivación del estado triplete producido por el disolvente es despreciable.

El rendimiento cuántico de luminiscencia (Φ) es un importante parámetro para la evaluación de la efectividad del proceso de emisión en los materiales luminiscentes. El rendimiento cuántico se define como la relación entre el número de fotones emitidos y absorbidos (Ecuación 1.1).²¹

$$\Phi = \frac{n^{\circ} \text{ de fotones emitidos}}{n^{\circ} \text{ de fotones absorbidos}} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Cuando el ion lantánido se encuentra en un complejo orgánico, el rendimiento cuántico de luminiscencia se puede expresar también por la Ecuación 1.2.²²

$$\Phi_{\text{tot}} = \eta_{\text{sens}} \cdot \Phi_{\text{Ln}} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

Donde el rendimiento cuántico de luminiscencia (Φ_{tot}) depende de la eficiencia de la transferencia de energía (η_{sens}) y por el rendimiento cuántico de la etapa de la luminiscencia de los lantánidos (Φ_{Ln}).

Φ_{Ln} , rendimiento cuántico de la etapa de la luminiscencia de los lantánidos está directamente relacionado con las constantes de desactivación radiativa (k_r) y no radiativa (k_{nr}), (Ecuación 1.3). Expresa la competencia entre los procesos radiativos y no radiativos.

$$\Phi_{\text{Ln}} = k_r / (k_r + k_{nr}) = k_r / k_{\text{obs}} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

El factor k_r es independiente de la temperatura, mientras que el factor k_{nr} depende de los diferentes procesos de desactivación no radiantes. Ambos procesos, radiativo y no radiativo, influyen en el tiempo de vida de luminiscencia observado, τ_{obs} , aunque no en el tiempo de vida radiativo, τ_r . De esta manera podríamos expresar el rendimiento cuántico en función de los tiempos de vida con la Ecuación 1.4

$$\Phi_{\text{Ln}} = \tau_{\text{obs}} / \tau_r \quad \text{Ecuación 1.4}$$

El tiempo de vida observado, τ_{obs} , se determina en la banda más intensa de luminiscencia y está definido por la Ecuación 1.5, donde $I(t)$ e I_0 son las intensidades de la banda de luminiscencia a $t=t$ y $t=0$, respectivamente

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad \text{Ecuación 1.5}$$

²¹ (a) M. Latva, H. Takalo, V.-M. Mikkala, C. Matachescu, J.C. Rodríguez-Ubis, J. Kankare; *J. Lum.* **1997**, 75, 149. (b) S. Fery-Forgues, D. Lavabre, *J. Chem. Educ.* **1999**, 76, 1260.

²² M.H.V. Werts, R. T. F. Jukes, J. W. Verhoeven; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, 4, 1542.

El tiempo de vida observado está directamente relacionado con constantes de velocidad de desexcitación de la luminiscencia observada.

$$\tau_{obs} = 1/k_{obs} \quad \text{Ecuación 1.6}$$

Sin embargo, la determinación del tiempo de vida radiante, τ_r , se realiza mediante la medida de τ_{obs} en agua deuterada a 77 K, para intentar minimizar al máximo el resto procesos no radiativos.

$$\tau_r = \tau_D^{77K} = k_r^{-1} \quad \text{Ecuación 1.7}$$

Generalmente, el rendimiento cuántico, Φ_{tot} , se calcula experimentalmente en relación a una disolución patrón, de rendimiento cuántico absoluto conocido, de acuerdo con la Ecuación 1.8.

$$\Phi_{tot} = \frac{IDOp \Phi_p}{IpDO} \quad \text{Ecuación 1.8}$$

Recientemente, Chauvin propuso el uso de $Cs_3[Eu(dpa)_3]$ como un estándar secundario específico para la determinación del rendimiento cuántico luminiscente de los complejos lantánidos.²³ El valor de rendimiento cuántico de este estándar secundario ($\Phi = 0.24$) fue determinado a partir de dos diferentes estándares orgánicos, el violeta de cresilo y la rodamina 101.

Como se ha detallado, el rendimiento cuántico está directamente relacionado con la eficiencia de los procesos radiativos y no radiativos.

En medios acuosos, la interacción con el agua (dentro y fuera de la esfera de coordinación del ion lantánido) es una de las principales rutas de desactivación de la luminiscencia, debido a las vibraciones O-H. Para un diseño eficaz de los quelatos, se han desarrollado diferentes aproximaciones para saber el número de moléculas de agua (q) que interaccionan con la esfera de coordinación.^{24, 25} El número de moléculas de agua coordinadas al centro lantánido, q (es decir, el número de moléculas de agua presentes en la esfera de coordinación interna del metal), puede ser cuantificado utilizando los tiempos de vida de luminiscencia en H_2O y D_2O .

$$q = A \cdot [\tau_{H_2O}^{-1} - \tau_{D_2O}^{-1} - B] \quad \text{Ecuación 1.9}$$

²³ A. S. Chauvin, F. Gumy, D. Imbert, J-C G. Bünzli; *Spectrosc. Lett.* **2004**, 37, 517. [Erratum: *Spectrosc. Lett.* **2007**, 40, 193.

²⁴ R. M. Supkowski and W. D. Horrocks, Jr., *Inorg. Chim. Acta*, **2002**, 340, 44.

²⁵ A. Beeby, I. M. Clarkson, R. S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A. S. de Sousa, J. A. G. Williams, M. Woods, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1999**, 493.

Donde el valor A es una constante y se asigna con 1.2 para el Europio y 5.0 para el Terbio y del mismo modo el valor B es -0.25 para el Europio y -0.06 para el Terbio.

La formación de quelatos minimiza q gracias a la saturación coordinativa o a la generación de impedimento estérico alrededor del centro metálico, atenuando así la desactivación por el disolvente y maximizando el término de rendimiento cuántico del ion lantánido (Φ_{Ln}).

Los quelatos, para su uso como sondas moleculares, deben formar complejos que saturen de forma estable la esfera de coordinación del $Ln(III)$ en un amplio intervalo de pH y que resistan a la hidrólisis.²⁶ Hoy el día, el diseño quelatos que cumplan estos requisitos continua siendo un reto para los científicos.

²⁶ D. Parker; *Aust. J. Chem.* **2011**, 64, 239

1.4. Diseño de Sondas Luminiscentes.

A partir de estas consideraciones sobre los procesos fotofísicos implicados en la luminiscencia de los iones lantánidos, numerosos autores han trabajado en el diseño de ligandos orgánicos con el fin de potenciar las propiedades luminiscentes de estos iones

En este sentido desde hace una década los avances en la química de los derivados poliheterocíclicos, y en concreto de la bispirazolilpiridina (*bpp*), han demostrado tener ciertas ventajas frente a otros ligandos que se han venido utilizando tradicionalmente, como las terpiridinas y sus derivados. Figura 1.5.

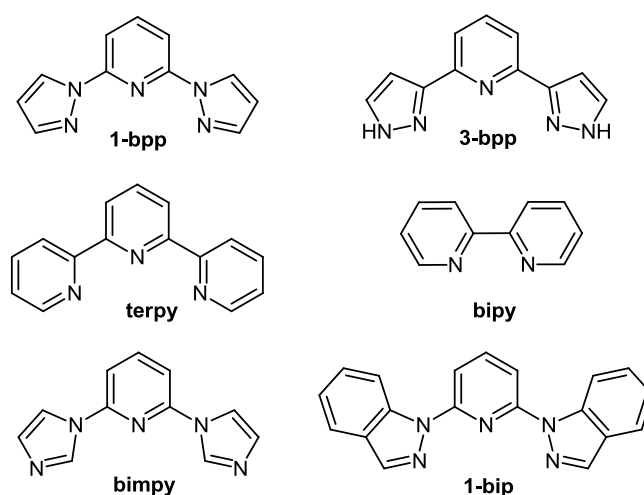


Figura 1.5

A pesar de la similitud estructural de este tipo de ligandos con la terpiridina, su química difiere de manera importante. Por un lado, la incorporación de diferentes heterociclos en el esqueleto del ligando, con diferentes basicidades y energías π -orbitálicas, tienen un efecto substancial en la riqueza electrónica, propiedades cinéticas y luminiscentes de los complejos metálicos resultantes. Por otro lado, el esqueleto bispirazolilpiridina, constituido por dos anillos de pirazol y uno de piridina, permite la síntesis de diferentes regioisómeros, en comparación con el sistema de terpiridina. Ambos isómeros del esqueleto de 2,6-bispirazolilpiridina son conocidos y siguen siendo estudiados en el campo de la química de coordinación por las interesantes propiedades de los complejos que forma.²⁷

La química de coordinación de los *bpp* se desarrolló inicialmente en dos áreas de investigación por sus aplicaciones prácticas:

²⁷ M.A. Halcrow; *Coord. Chem. Rev.* **2005**, 249, 2880, y sus referencias

1º Complejos luminiscentes de lantánidos fuertemente emisores con aplicaciones bioanalíticas.^{28,29} Este potencial ha sido ya demostrado, entre otros, en inmunoensayos homogéneos y heterogéneos, fluoroensayos FRET o en bioensayos para determinar la concentración de diferentes proteínas.

2º Complejos de hierro con propiedades “spin-crossover” (cambio de las propiedades magnéticas de un compuesto de coordinación inducido mediante la variación de un campo eléctrico o magnético, temperatura, etc...)^{30,31}

Mientras estas áreas continúan en expansión, más recientemente los derivados de bispirazolilpiridina están ampliando su abanico de áreas de investigación, como catálisis,³² materiales,³³ fotosensibilizadores de células solares,³⁴ etc.³⁵

Este trabajo, contando con la experiencia adquirida por nuestro grupo de investigación en la química de coordinación con los lantánidos, se centrará en la síntesis y química de coordinación de ligandos derivados del 2,6-di(pirazol-1-il)piridina (1-*bpp*) y 2-(pirazo-1-il)-6-(indazol-1-il)piridina (1-*ipp*), y sus aplicaciones luminiscentes.

1.4.1. Síntesis de compuestos derivados del 1-*bpp*

Desde que se publicase el primer método de síntesis de los derivados de 1-*bpp* a principio de la década de los noventa, bautizado como acoplamiento nucleofílico de aniones pirazólicos en 2,6-dihalopiridinas, han sido numerosos los trabajos que hasta nuestros días han continuado utilizando este método para la síntesis de derivados 1-*bpp*.³⁶

²⁸ E. Brunet, O. Juanes, R. Sedano and J.-C. Rodríguez-Ubis, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, *1*, 613.

²⁹ H.C. Löhmansröben, J. Cywiński, K. N. Nono, L. J. Charbonnière, T. Hammann. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, *16*, 6060.

³⁰ M.A. Halcrow, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2493.

³¹ J.Olguín, S. Brooker. *Coord. Chem. Rev.*, **2011**, *255*, 203.

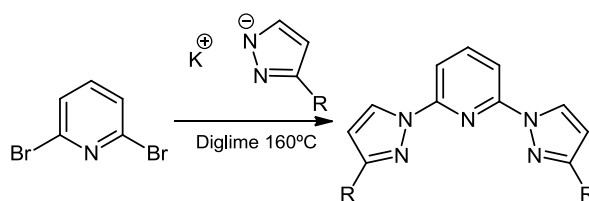
³² Y.-T. Li, B.S. Liao, H.P. Chen, S.-T. Liu, *Synthesis*, **2011**, 2639.

³³ F. El Hallak, P. Rosa, P. Vidal, I. Sheikin, M. Dressel, J. van Slageren, *EPL*, **2011**, *95*, 57002.

³⁴ A. Hagfelt, G. Boschloo, L. Sun, L. Kloo, H. Pettersson. *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 6595.

³⁵ R.J. Brandon, T. Konovalova, P.J. Desrochers, P. Pulay, D.A. Vicic, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 13175

³⁶ D.L. Jameson, K.A. Goldsby. *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 4992.



Esquema 1.1

El precursor más utilizado ha sido la 2,6-dibromopiridina, aunque las dicloro- y difluoropiridinas han sido ampliamente utilizadas, especialmente si el anillo de piridina tiene un grupo dador de electrones adicional (Y) como sustituyente.³⁷ Los rendimientos de estas reacciones tienen una fuerte dependencia de la presencia de los diferentes sustituyentes presentes sobre el anillo de la piridina. El rendimiento puede incrementarse también si se añade un exceso del reactivo pirazólico.

Es importante señalar que aunque la utilización de pirazoles asimétricamente sustituidos implica el riesgo de obtener mezclas de regioisómeros debido a la tautomería del anillo de pirazol con el posible ataque de cualquiera de los nitrógenos sobre el anillo de piridina, la reacción transcurre con cierta regioselectividad, obteniéndose como producto mayoritario el regioisómero I en la mayoría de los casos.

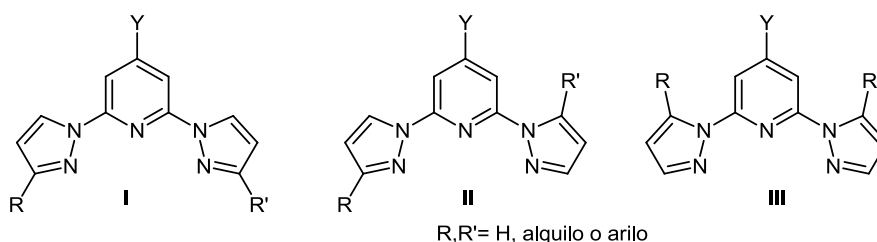


Figura 1.6

De esta manera se han reportado un gran número de ligandos de simetría C₂, con grupos alquilo y arilo como sustituyentes del pirazol, incluyendo derivados quirales ópticamente puros.

³⁷ a) T. Vermonden, D. Branowska, A.T.M. Marcelis, E.J.R. Sudhölter, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 5039. b) C. Klein, E. Baranoff, M. Grätzel, M. K. Nazeeruddin, *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 584.

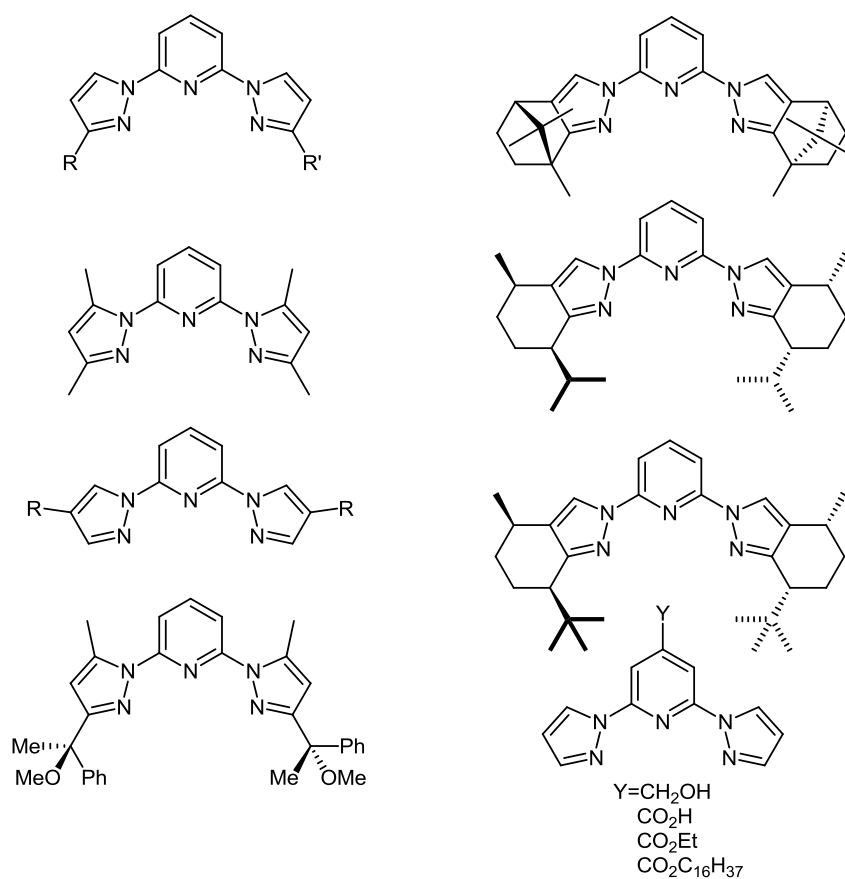


Figura 1.7

Pese a los buenos rendimientos y alta regioselectividad en la síntesis de estos ligandos, comúnmente se obtiene como impureza el intermedio monosustituido, y en ocasiones, aunque el impedimento estérico es alto, se ha obtenido producto **II** con moderados rendimientos (8-12%), como se muestra en los ligandos representados en la Figura 1.8.

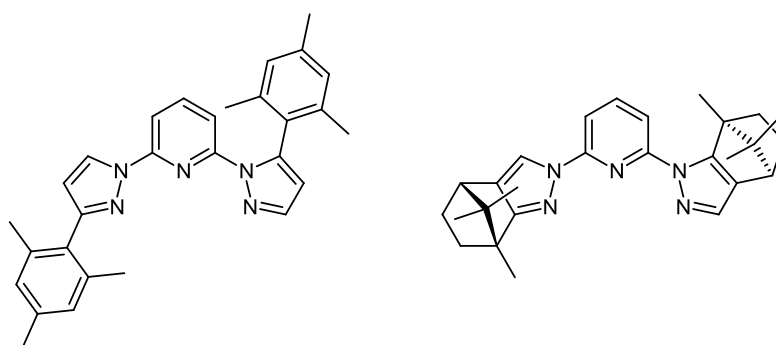


Figura 1.8

La obtención del derivado monosustituido, además de como impureza de la reacción de disustitución, permite su uso como producto de partida en la síntesis de los derivados

de 1-bpp disustituídos asimétricamente, añadiendo en la segunda etapa un equivalente de una sal de pirazol diferente, utilizando para ello las mismas condiciones.³⁸

Aunque de este tipos de ligandos no-simétricos los antecedentes bibliográficos son pocos, no existen antecedentes en los que el sustituyente Y sobre la piridina sea diferente a H. La síntesis de este tipo de estructuras en las que se pueden combinar diferentes funcionalizaciones resulta muy interesante, al poder modular las propiedades de los ligandos en función de los pirazoles elegidos. En este trabajo se recogen los resultados obtenidos en la síntesis de este tipo de ligandos no-simétricos con diferentes sustituyentes en la posición *para* de la piridina.

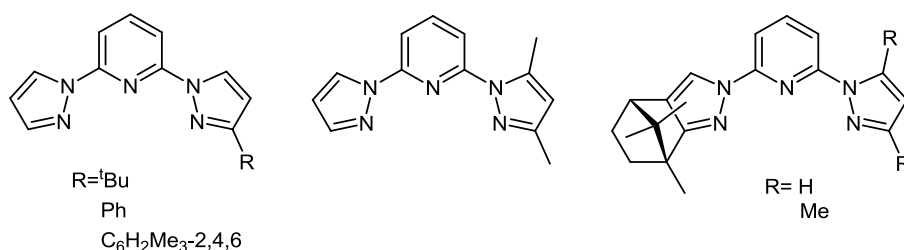
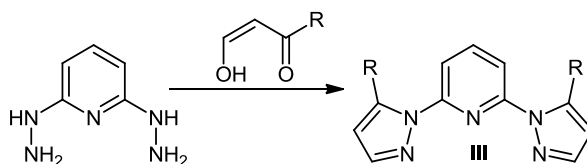


Figura 1.9

Como se ha comentado anteriormente, la regioselectividad de las reacciones de disustitución con pirazoles sustituidos es muy alta, por lo cual para la síntesis de diferentes regioisómeros se han publicado diferentes rutas sintéticas. Es sabido que los pirazoles pueden ser sintetizados al hacer reaccionar hidracinas con β -dicetonas,³⁹ esto fue aprovechado Garner para la síntesis de este tipo de bispirazolilpiridinas.⁴⁰ El empleo de la 2,6-di(hidrazino)piridina como producto de partida permite que se forme la bispirazolilpiridina al reaccionar con dos equivalentes de la β -dicetona elegida en presencia de un medio catalítico ácido (Esquema 1.2).



Esquema 1.2

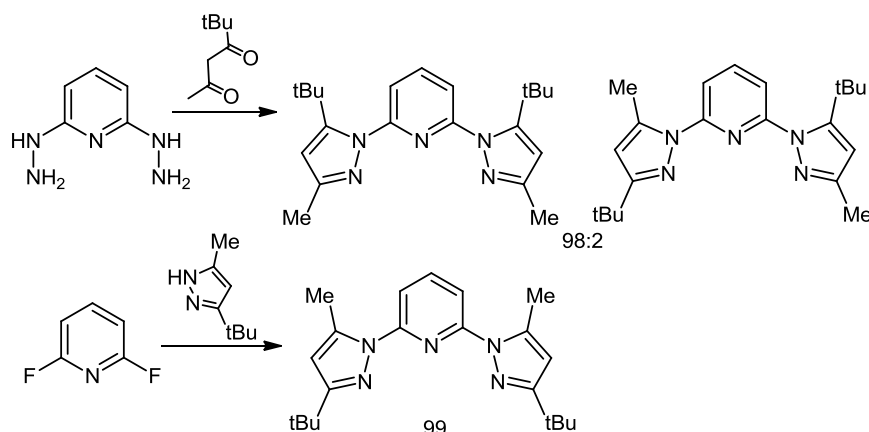
Esta ruta, presenta como ventaja la posibilidad de obtener, como producto mayoritario, isómeros con una regioselectividad opuesta al método clásico (III). En el Esquema 1.3 se

³⁸ D. Jameson, K. Goldsby. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4992.

³⁹ L. Knorr; *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.* **1883**, 16: 2597.

⁴⁰ K. A. Brien, C. M. Garner, K. G. Pinney; *Tetrahedron*, **2006**, 62, 3663.

muestran los diferentes derivados de 1-bpp que se obtienen mediante el uso de dihidrazinopiridina y difloropiridina como reactivos de partida.



Esquema 1.3

Esta nueva metodología para la síntesis de derivados del 1-bpp con sustituyentes voluminosos en las posiciones 5'-5'' de los anillos pirazólicos se revela como una alternativa sintética con potenciales aplicaciones químicas, como la preparación de ligandos quirales no racémicos.⁴¹

Sin embargo, la limitación de este método son las dificultades sintéticas que implica obtener los derivados de 2,6-bishidrazinopiridina, ya que son sensibles a la temperatura, y a atmosferas oxidantes

La síntesis de derivados de 1-bpp con grupos químicamente modificables en los pirazoles resulta de gran importancia, ya que estos pueden ser transformados en estructuras más complejas, permitiendo la introducción de grupos funcionales que mejoren la capacidad quelante de estos ligandos, que como hemos visto es una propiedad muy importante de estos ligandos.^{42,43} Un ejemplo importante es el 2,6-bis(3',3''-dietoxicarbonil-pirazol-1',1''-il)piridina, donde los grupos ésteres pueden ser modificados a ácidos, u otros grupos, los cuales mejoran las propiedades quelantes de estos ligandos(Esquema 1.4).^{44,45}

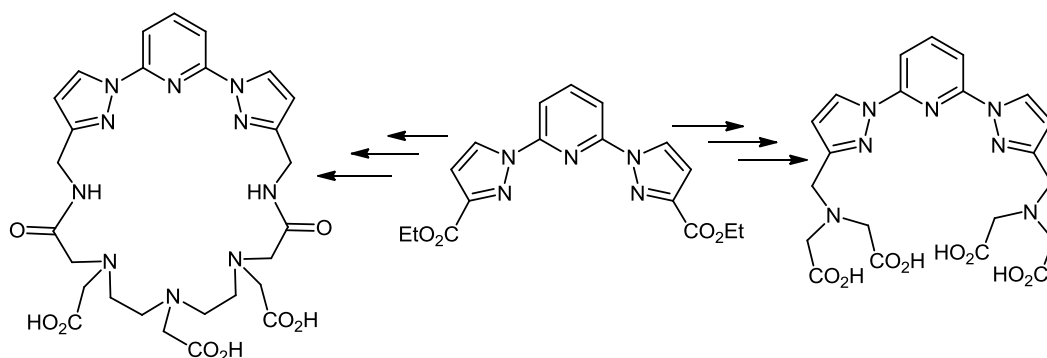
⁴¹ N.C. Duncan, C. M. Garner, Y. Nguyen, F. Hung, K. Klausmeyer, *Tetrahedron Lett.*, **2011**, 52, 5214.

⁴² R. Pritchard, C.A. Kilner, S. A. Barret. M. A. Halcrow, *Inorg. Chim. Acta*, **2009**, 362, 4365.

⁴³ X.J. Zhu, B.J. Holliday, *Macromol. Rapid Commun.*, **2010**, 31, 904.

⁴⁴ M.J. Remuinan, H. Roman, M.T. Alonso, J.C. Rodríguez-Ubis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.2* **1993**, 1099.

⁴⁵ E. Brunet, O. Juanes, R. Sedano, J.C. Rodríguez-Ubis, *Org. Lett.*, **2002**, 4, 213.



Esquema 1.4

Hasta este punto se ha hecho una revisión de la síntesis de los derivados de 1-bpp, pero han sido escasos los ejemplos en los que el anillo de piridina tiene más sustituyentes que los anillos de pirazol. El desarrollo de la química de las piridinas polihalogenadas ha permitido la síntesis de nuevas piridinas funcionalizadas en diferentes posiciones (Figura 1.10),⁴⁶ las cuales están permitiendo a los investigadores acceder a numerosas nuevas estructuras.

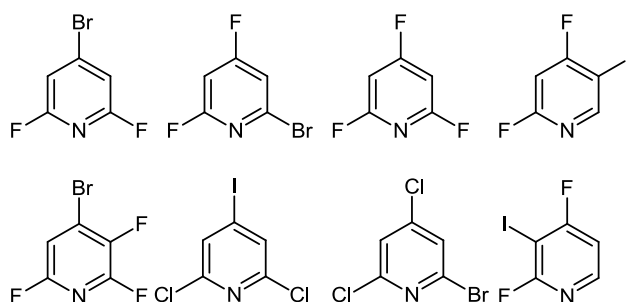


Figura 1.10. Diferentes piridinas polihalogenadas.

Entre estos productos, ha destacado el uso de los derivados polifluorados, como la 4-bromo-2,6-difluoropiridina,⁴⁷ la cual es un producto de partida altamente versátil en la síntesis de piridinas trisustituidas, como las que se muestran en este trabajo. La alta selectividad y eficiencia de sustitución de los átomos de flúor frente a nucleófilos, como el pirazol u otros heterociclos, permite obtener los derivados di- o mono-sustituidos en las posiciones orto del anillo de piridina. Además la posición bromada permite llevar a cabo sustituciones nucleófilas regioselectivas y reacciones de acoplamiento vía paladio.

⁴⁶ M. Schlosser, C. Bobbio, T. Rausis *J. Org. Chem.*, , **2005**, 70, 7, 2494.

⁴⁷ P. Kadjane, M. Stark, F. Camerel, N. Hill, N. Hildebrandt, R. Ziessel, L. J. Charbonniere, *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 4601.

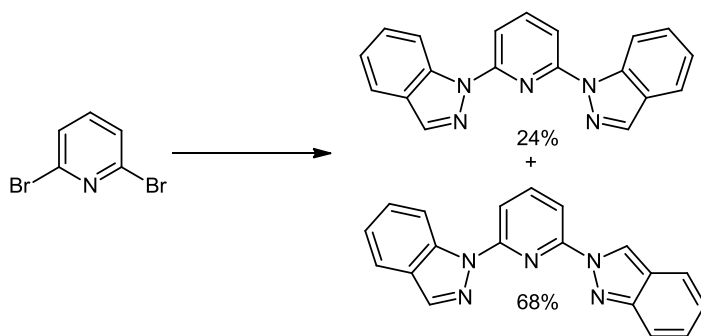
Estas características hacen de la 4-bromo-2,6-difluoropiridina el producto de partida idóneo para multitud de reacciones.

1.4.2. Síntesis de compuestos derivados del Bisindazolilpiridina (1-bip) y de inzolilpirazolilpiridina (1-ipp)

A la vista del amplio abanico de aplicaciones que tiene la 1-bpp, y debido al incremento en la conjugación y la planaridad que aporta el anillo de indazol, recientemente se publicaron los primeros métodos de síntesis de derivados del 1-bip.⁴⁸

La sustitución de los anillos de pirazol por anillos de indazol aumenta la conjugación lo que se provoca un mayor desplazamiento hacia el rojo de sus bandas de absorción. Además aumenta la planaridad de la molécula lo cual puede ser aprovechado en la síntesis de nuevos materiales moleculares ya que pueden apilarse por fuerzas π - π .

En la primera síntesis de estos derivados se hace reaccionar la 2,6-dibromopiridina con dos equivalentes de la sal sódica del indazol, al igual que en el caso de la síntesis de las bispirazolilpiridinas, obteniéndose una mezcla de regioisómeros (Esquema 1.5), debido de nuevo a la tautomería del indazol y a la ausencia de efectos electrónicos y estéricos que influyan en la regioselectividad de la sustitución.

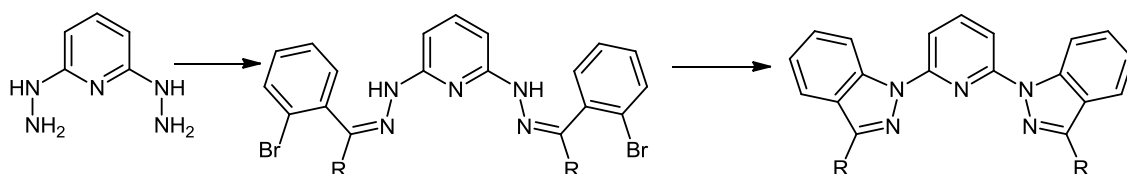


Esquema 1.5 Síntesis de los derivados de 2,6-bis-(indazolil)piridina. Reactivos y condiciones: 2 eq. Na[Ind], diglime, 140 °C, 4 d.

A la vista de los resultados obtenidos y con la intención de controlar la regioselectividad de la reacción, Garner propuso el uso de la 2,6-di(hidrazino)piridina como producto de

⁴⁸ R. Pritchard, C.A. Kilner, M.A. Halcrow. *Tetrahedron Lett.*, **2009**. 50, 2484.

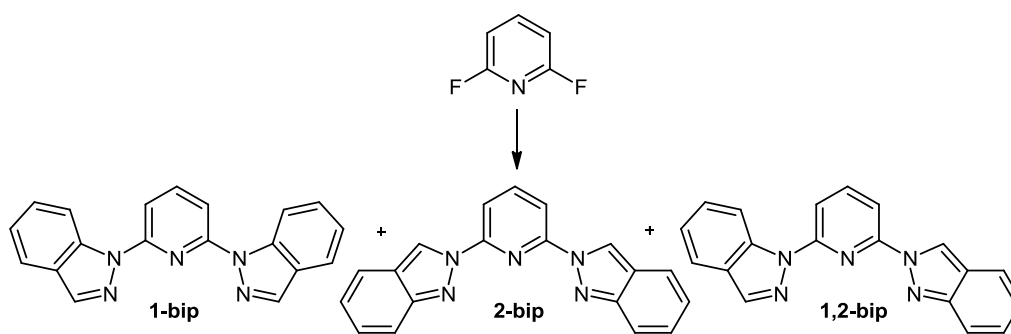
partida (Esquema 1.6), al igual que para la síntesis de los derivados de 1-bpp.⁴⁹ Las bishidrazonas pueden ser obtenidas fácilmente mediante la reacción de la dihidrazinopiridina con el aldehído correspondiente en un medio catalítico de ácido paratoluensulfónico o trifluoroacético. La ciclación posterior se realiza en medio básico con cobre como catalizador, obteniéndose los ligandos deseado con rendimientos casi cuantitativos (Rto=98%).



Esquema 1.6

Pese a los buenos rendimientos de la reacción, la dificultad de encontrar aldehídos que respondan a las exigencias sintéticas de este método, no ha permitido la implantación de este método como método de síntesis de derivados de bisindazolpiridina.

A la vista de las altas eficiencias observadas al utilizar piridinaspolifluoradas, recientemente se ha descrito la síntesis de estos derivados de *bip* a partir de la difluoropiridina, obteniéndose mezclas de todos los regioisómeros posibles, los cuales solo fueron posibles de aislar por cristalización.⁵⁰



Esquema 1.7

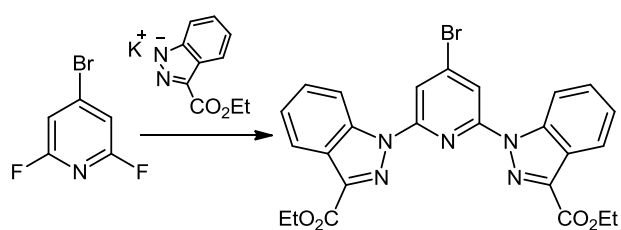
La mayor reactividad de sustitución de los átomos de flúor, frente a los de bromo, hace posible obtener con moderados rendimientos el producto 2-bip, el cual corresponde al

⁴⁹ N. C. Duncan, C. M. Garner. *Tetrahedron Letters*, **2011**, 52, 5214.

⁵⁰ A.Santoro, L. Cook, R. Kulmaczewski, S. Barrett, O. Cespedes, M. Halcrow. *Inorg. Chem.* **2015**, 54, 682.

producto formado por el control cinético de la reacción, mientras que el 1-bip es el obtenido por el control termodinámico.

Pero los problemas de regioselectividad pueden ser solventados, utilizando indazol con mayor impedimento estérico y/o demanda electrónica. Al igual que en los derivados de 1-bispirazolilpiridina, Ziessel y cols. propusieron el uso del 3-etoxicarbonilindazol y la 4-bromo-2,6-difluoropirindina como reactivos de partida para obtener ligandos derivados del 1-bip (Esquema 1.8).⁵¹ La utilización de indazoles 3-sustituidos, favorece la formación mayoritaria del regioisómero 1, debido a factores electrónicos además de estéricos. Además la presencia de grupos químicamente modificables en el anillo de indazol y piridina permite su transformación en moléculas más complejas.



Esquema 1.8

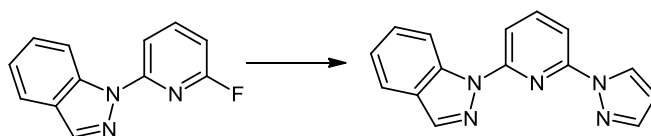
AL igual que en las bispirazolilpiridinas, la síntesis de ligandos de bisindazolilpiridinas asimétricamente sustituidas resulta un reto interesante, debido a la posibilidad de controlar las propiedades de los ligandos, en este sentido, nuestro grupo de investigación ha sintetizado diferentes ligandos asimétricos, los cuales tienen posibles aplicaciones en bioensayos.⁵²

El control adquirido en los últimos años en la síntesis de bispirazolilpiridinas y bisindazolilpiridinas, ha contribuido de gran manera en la síntesis de estructuras que combinen los anillos de pirazol e indazol, y de esta manera intentar explotar las buenas propiedades quelantes de los bispirazoles con una mayor conjugación aportada por el anillo de indazol. Recientemente Halcrow describió la síntesis del 1-ipp (indazolilpirazolilpiridina) y 2-ipp a partir de la los correspondientes 2-fluor-6-indazolpiridinas.⁵³

⁵¹ M. Stark, P. Kadjane, E. Bois, B. Darbouret, A. Incamps, R. Ziessel, L.J. Charbonnière. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9164.

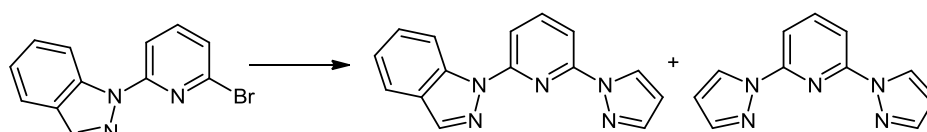
⁵² Laura Galan. *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Madrid, Junio **2015**.

⁵³ A.Santoro, L. Cook, R. Kulmaczewski, S. Barrett, O. Cespedes, M. Halcrow. *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 682.



Esquema 1.9

Anteriormente, se realizaron diferentes aproximaciones utilizando como material de partida la 2,6-dibromopiridina. Esta vía sintética además de formar el producto deseado, daba como producto secundario la bispirazolipiridina. Esto ocurre por el desplazamiento del anillo de indazol por un anillo de pirazol.



Esquema 1.10

De igual manera, la síntesis de los 1-ipp se intentó abordar a partir de la 2-bromo-6-pirazolpiridina sin llegar a obtenerse el producto deseado.



Esquema 1.11

A la vista de los antecedentes presentados, en este trabajo se empleará como reactivo la 2,6-difluoro-4-bromopiridina para el acceso a ligandos de tipo antena con diferentes sustituyentes sobre la piridina. Aprovechando la versatilidad sintética que ofrece este producto de partida se describirán nuevas rutas sintéticas que solventan algunos de los problemas sintéticos mencionados anteriormente. Además la presencia del átomo de bromo en la posición 4 de la piridina abrirá las puertas a la síntesis de nuevas estructuras tipo piridinas trisustituidas, las cuales tienen buenas propiedades quelatantes de iones.

1.1. Aplicaciones de sondas luminiscentes en el marcaje de oligonucleótidos

Una vez puestas de manifiesto las propiedades estructurales y complejantes de los ligandos poliheterocíclicos basados en anillos de pirazol y/o indazol, y las propiedades luminiscentes de los lantánidos, pasaremos a describir las aplicaciones que en el ámbito bioclínico se van a desarrollar con estos complejos para el reconocimiento de material genético. Para ello se utilizarán oligonucleótidos en los que se conjugaran nuestros compuestos.

1.1.1. Aspectos generales de la conjugación de Oligonucleótidos para su aplicación médica

Los ensayos clínicos utilizando oligonucleótidos conjugados están siendo desarrollados y evaluados para mejorar las propiedades terapéuticas, diagnósticas, y materiales de los oligonucleótidos. En esta sección, ofrecemos una breve descripción de las diferentes clases de oligonucleótido conjugados utilizados junto con algunos ejemplos representativos.

- Oligonucleótidos Fluorescentes

El empleo de sondas de oligonucleótidos marcadas con cromóforos fluorescentes (fluoróforo) juega un importante papel en la detección rápida y específica de secuencias de ARN, mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH).⁵⁴ Esta técnica permite la visualización, distinción y estudio de las sondas de manera selectiva al hibridarse al ARN. De esta manera al emplear la longitud de onda adecuada se excitará el fluoróforo y emitirá la fluorescencia específica (Figura 1.11).

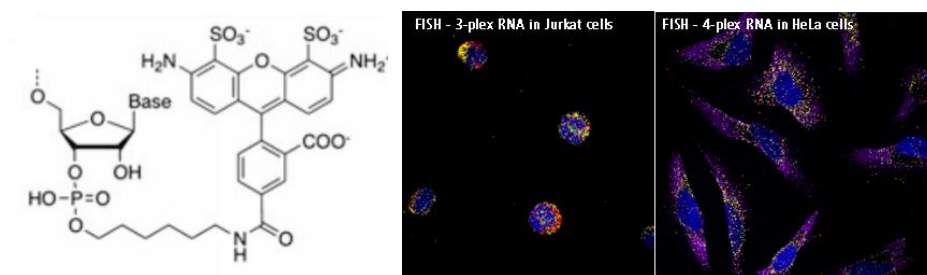


Figura 1.11

Además, el uso de fluoróforos ha reemplazado a las sondas de carácter radiactivo, por su mayor seguridad, eficacia y facilidad de detección.

- Oligonucleótidos conjugados a péptidos

⁵⁴ K.Wang, Z. Tang, C. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Wu, C. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, W. Tan. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2009**; 48, 5, 856.

El interés en péptidos conjugados en oligonucleótidos deriva del hecho de que hay ciertos péptidos, que poseen la notable capacidad de atravesar las membranas celulares por un mecanismo que no implica la endocitosis mediada por un receptor.⁵⁵ En consecuencia, hay un enorme interés en el desarrollo de diseño de péptidos conjugados a oligonucleótidos (POC) para mejorar la entrega de oligonucleótidos, los cuales pueden combatir diferentes enfermedades como el VIH.

⁵⁶

Sin embargo, este es un campo aun por desarrollar ya que la síntesis de los POC no es sencilla debido a la incompatibilidad química que presentan muchas veces los péptidos y oligonucleótidos.⁵⁷

- Oligonucleótidos conjugados a carbohidratos

Las principales vías de reconocimiento celular se basan en las interacciones proteína-carbohidrato. Las superficies de las células están cubiertas por las proteínas de unión de azúcar (es decir, lectinas), que están implicados en los procesos biológicos esenciales como la transducción de señales y la adhesión celular. Estas lectinas son capaces de reconocer e internalizar glicoproteínas que llevan restos de carbohidratos específicos a través de endocitosis. Por lo tanto, hay un interés en el diseño y desarrollo de carbohidratos conjugados a oligonucleótidos para mejorar la célula pobre o la entrega específica de tejido de oligonucleótido a través de endocitosis mediada por receptor

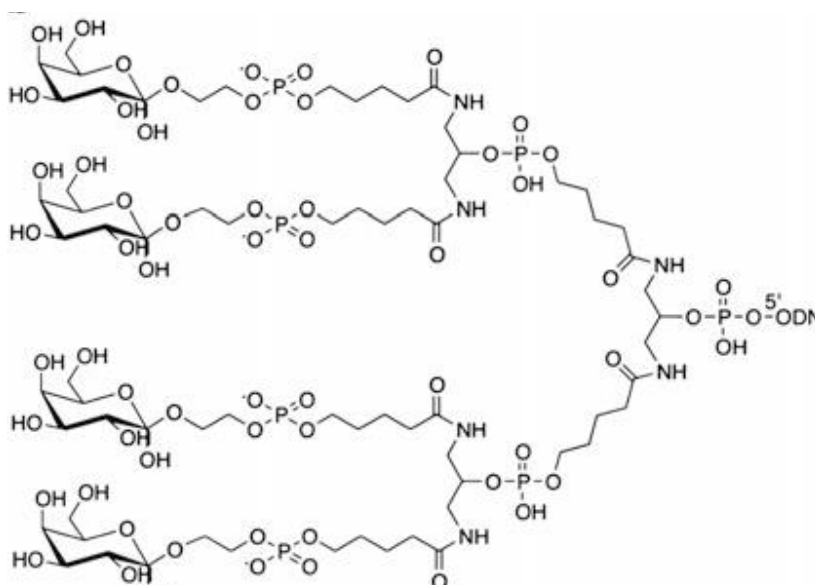


Figura 1.12

- Oligonucleótidos conjugados a polímeros

⁵⁵ M. Gait. Cell Mol Life Sci. **2003**, 60, 84.

⁵⁶ F. Marlin, P. Simon, T. Saison-Behmoaras, C. Giovannangeli. ChemBioChem **2010**, 11, 1493.

⁵⁷ H. Lönnberg. Bioconjugate Chem., **2009**, 20, 6, 1065.

Los polímeros se utilizan como soporte para la entrega de oligonucleótidos.⁵⁸ El uso de polímeros puede reducir la toxicidad y mejorar las características farmacocinéticas de los oligonucleótidos conjugados. Entre los polímeros más empleados, es el PEG (polietilenglicol) el más utilizado para aplicaciones farmacéuticas.⁵⁹ Otra ventaja del uso de polímeros es la presencia de múltiples sitios de unión, por lo que pueden transportar diferente número y tipo de oligonucleótidos.

- Oligonucleótidos conjugados a nanopartículas.

La conjugación de oligonucleótidos en nanopartículas se utiliza para desarrollar nanomateriales que combinen propiedades fotofísicas, electrónicas y/o catalíticas de las nanopartículas con la capacidad de reconocimiento de los oligonucleótidos.

Por ejemplo, las nanopartículas de oro son unos eficientes transportadores de fármacos, genes y ARN (Figura 1.13).⁶⁰ En estudios recientes se ha demostrado que estas nanopartículas entregaron shRNA (de interferencia) eficientemente en tumores implantados en ratones.⁶¹ Estas partículas detuvieron con éxito el crecimiento agresivo de tumor, ya que su volumen se redujo al 36%.⁶²

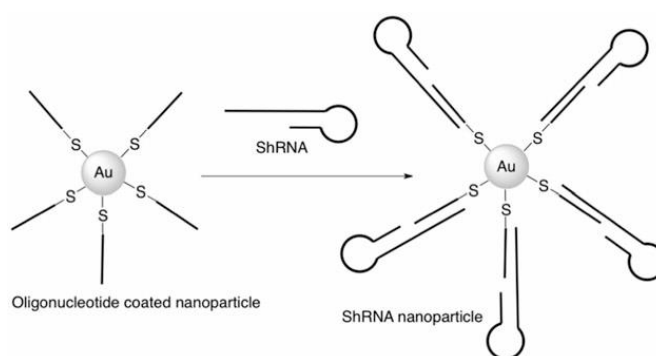


Figura 1.13

- Oligonucleótidos conjugados a complejos metalo-orgánicos

⁵⁸ a) D. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, P. Stayto. *Nat Rev Drug Discov.* **2005**, 4, 7, 581. b) D. Smith, A. C. Holley, C. L. McCormick. *Polym. Chem.*, **2011**, 2, 1428.

⁵⁹ J. Harris, R. Chess *Nat Rev Drug Discov.* **2003**, 2:214.

⁶⁰ P. Ghosh, G. Han, M. De. *Adv Drug Deliv Rev.* **2008**, 60, 1307.

⁶¹ S. Ryou, M. Park, J. Kim, C. Jeon, C. Yun, S. Kim, Y. Lee, M. Han, J. Bae, K. Lee. *J. Biotechnol.* **2011**, 10, 156, 2, 89.

⁶² S. Ryou, J. Kim, H. Jang, J. Kim, J. Yeom, M. Eom, Y. Lee, M. Han, J. Bae, K. Lee. *Biochem Biophys Res Commun.* **2010**, 398, 542.

Se ha demostrado que los oligonucleótidos conjugados con complejos metálicos son útiles en estudios de transferencia de electrónica,⁶³ como nucleasas artificiales,⁶⁴ fotosondas, andamios supramoleculares,⁶⁵ y catalizadores asimétricos.⁶⁶

En este contexto los iones lantánidos tienen una gran importancia, por ejemplo se han empleado complejos de cerio conjugados sobre oligonucleótidos como *tijeras* (nucleasa) para romper cadenas de ADN selectivamente (Figura 1.14). Sin embargo en este ejemplo no se emplea la luminiscencia de estos iones.

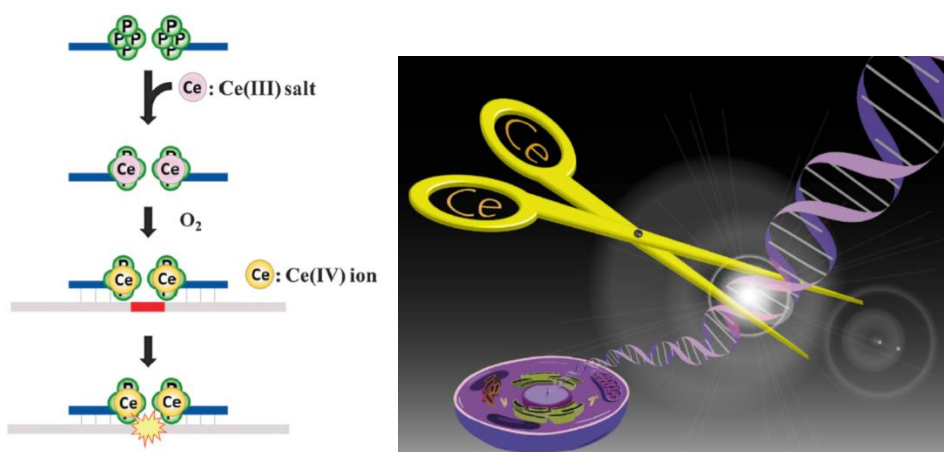


Figura 1.14

- Oligonucleótidos conjugados con iones lantánidos luminiscentes

Los complejos de europio se han utilizado para desarrollar un ensayo de luminiscencia para detectar la hibridación de oligonucleótidos.^{67,68} Para ello se crea un complejo que funciona como un interruptor molecular.

⁶³ "Sequence-Dependent DNA Dynamics: The Regulator of DNA-Mediated Charge Transport" M.A. O'Neill, J.K. Barton, in *Charge Transfer in DNA: From Mechanism to Application*, ed. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH, **2005**, 27.

⁶⁴ a) T. Lönnberg, Y. Aiba, Y. Hamano, Y. Miyajima, J. Sumaoka, M. Komiyama. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 855.
b) Y. Aiba, J. Sumaoka, M. Komiyama. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 5657.

⁶⁵ S. Ghosh, E. Defrancq *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 1278.; T. Bandy, A. Brewer, J. Burns, G. Marth, T. Nguyen, E. Stulz *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 138.

⁶⁶ A. Boersma, R. Megens, B. Feringa, G. Roelfes *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 2083.

⁶⁷ K. Yoshikawa, J. Yuan, K. Matsumoto, H. Kimura, *Anal. Sci.* **1999**, *15*, 121.; Y. Kitamura, T. Ihara, Y. Tsujimura, T. Osawa, D. Sasahara, M. Yamamoto, K. Okada, M. Tazaki, A. Jyo, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1921

⁶⁸ U. Karhunen, L. Jaakkola, Q. Wang, U. Lamminmäki, T. Soukka. *Anal. Chem.* **2010**, *Vol. 82*, No. 2, 15.A. Lehmusvuori A. Tapio, P. Mäki-Teeri, K. Rantakokko-Jalava, Q. Wang, H. Takalo, T. Soukka. *Anal. Biochem.* **2013**, *436*, 16.

Esta metodología fue introducida por Oser y Valet en 1990,⁶⁹ y requiere la síntesis de dos sondas conjugadas covalentemente mediante un enlace tiourea, una a un quelato portador del ion lantánido luminiscente y otra se conjuga al ligando antena. Ambos fragmentos no son luminiscentes pero la adición del oligonucleótido diana inducida por la formación de plantilla de complejo de quelato mixto altamente luminiscente (excitación a 340 nm. y emisión a 615 nm.), con un límite de detección de la hibridación en la escala de pico-moles. La señal obtenida es muy específica en presencia del analito debido a que dos fragmentos necesitan unirse para generar la señal. (Figura 1.15).

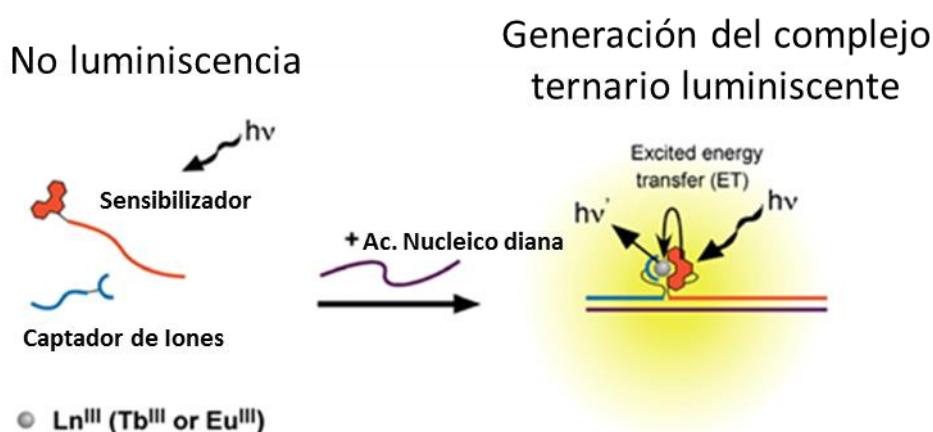


Figura 1.15

Esta aplicación de la luminiscencia de los lantánidos ha demostrado ser efectiva además de en ensayos de hibridación de ácidos nucleicos⁷⁰⁻⁷³ en ensayos de amplificación nucleica,⁷⁴ así como en detección de proteínas.⁷⁵ Todas estas aplicaciones utilizan el mismo principio fundamental: La formación de un complejo ternario mediante el cual produzca la señal específica de luminiscencia de lantánidos.

En este contexto y con estos antecedentes, este proyecto de tesis pretende abordar la preparación de nuevos ligandos antena, basados en los esqueletos poliheterocíclicos ya

⁶⁹ A. Oser, G. Valet. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29, 1167.

⁷⁰ U. Karhunen, M. Soikkeli, S. Lahdenperä, T. Soukka, *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 772, 87.

⁷¹ Y. Kitamura, T. Ihara, Y. Tsujimura, Y. Osawa, D. Sasahara, M. Yamamoto, K. Okada, M. Tazaki, A. Jyo, *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, 102, 1921.

⁷² G. Wang, J. Yuan, K. Matsumoto, Z. Hu, *Anal. Biochem.*, **2001**, 299, 169.

⁷³ A. Lehmusvuori, U. Karhunen, A.H. Tapio, U. Lamminmäki, T. Soukka, *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 731, 88.

⁷⁴ A. Lehmusvuori, A.H. Tapio, P. Mäki-Teeri, K. Rantakokko-Jalava, Q. Wang, H. Takalo, T. Soukka, *Anal. Biochem.* **2013**, 436, 16.

⁷⁵ H. Pääkilä, S. Blom, K. Kopra, T. Soukka, *Analyst*, **2013**, 138, 5107.

mencionados, que sean capaces de actuar como sensibilizadores de iones lantánidos, para el marcaje de los oligonucleótidos de las bacterias causantes de sepsis.

1.2. Complejos luminiscentes de ligandos derivados de 1-bpp y 1-bip.

Los complejos luminiscentes de 1-bpp han sido ampliamente estudiados en la química de complejación de iones lantánidos. Su esqueleto tridentado hace de ellos unos eficientes sensibilizadores para iones lantánidos (efecto antena). Además la incorporación de grupos quelantes (como grupos carboxilatos o aminos) permite una mayor coordinación al ion, aislándolo del medio.

En la carrera por sintetizar nuevos ligandos sensibilizadores capaces de aislar al ion lantánido del medio nuestro grupo de investigación sintetizó de ligandos funcionalizados con el ácido iminodiacético (Figura 1.16).⁴⁵

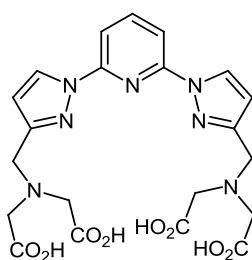


Figura 1.16

Estos podandos son capaces de encapsular iones lantánidos en disoluciones acuosas con un número de hidratación menor a la unidad, además presentan altos tiempos de vida y altos rendimientos de emisión para diferentes iones lantánidos. La funcionalización del anillo de piridina permite que una amplia variedad de grupos funcionales puedan adherirse al esqueleto del podando modificando sus propiedades fotofísicas, y/o permitiendo su anclaje a diferentes superficies (Figura 1.12).⁷⁶ En el ligando **A** estos grupos R, tienen un fuerte efecto sobre el rendimiento cuántico del complejo [Ln(LigandoA)], ya que pueden modificar el entorno del ion para una complejación más efectiva. La aplicación de este tipo de ligandos es muy amplia,^{77,78} destacando en la química médica, como detectores de antígenos de diferentes enfermedades.⁵¹

⁷⁶ P. Kadjane, M. Stark, F. Camerel, D. Hill, N. Hildebrandt, R. Ziessel, L.J. Charbonnière. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 4601.

⁷⁷ Z. Ye, G. Wang, J. Chen, X. Fu, W. Zhang, J. Yuan, *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, *26*, 1043.

⁷⁸ a) Z. Ye, J. Chen, G. Wang, W. Zhang, J. Yuan. *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 4163. b) G. Cui, J. Chen, Z. Ye, G. Wang, J. Yuan. *Talanta*, **2011**, *84*, 971.

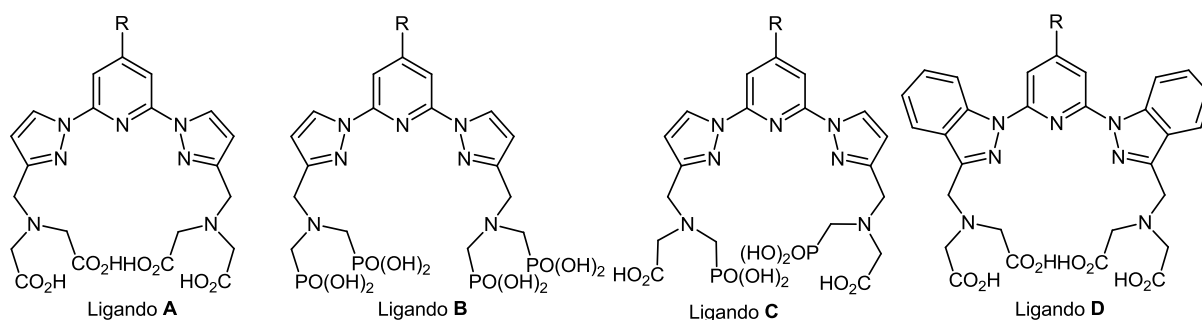


Figura 1.17

Recientemente, han sido publicados nuevos ligandos nonadentados análogos a este tipo de ligandos **A**, que presentan como grupos quelantes grupos fosfonatos (Ligando **B**), ligandos mixtos carboxilo-fosfonatos (Ligando **C**)⁷⁹ o que incorporan anillos de indazol en lugar de anillos de pirazol (Ligando **D**).

Al igual a los derivados tetracarboxílicos, estos tienen buenas propiedades fotofísicas, además la presencia de grupos fosfonato aumenta su estabilidad química.⁸⁰ Estas propiedades permiten su uso en el diagnóstico clínico⁸¹ y en la fototerapia⁸², aplicaciones para las cuales han sido patentados.

El uso de nuevos productos de partida, como las piridinas polihalogenadas, descritas anteriormente, permite obtener ligandos nonadentados análogos al Ligando **A** y **D**. En este trabajo se recoge la síntesis de nuevos ligandos en los que la posición cuatro de la piridina estará sustituida por diferentes grupos cromóforos, en un intento de mejorar las propiedades fotofísicas de los complejos ya descritos, y se estudiarán sus propiedades fotofísicas al formar complejos con iones lantánidos.

En un intento por mejorar las buenas propiedades quelantes y alta estabilidad que demostraron los complejos nonadentados con iones lantánidos, en nuestro grupo de laboratorio se realizaron diferentes aproximaciones macrocíclicas, para aumentar la capacidad de los ligandos de aislar a los iones lantánidos del medio.^{83,84}

⁷⁹ N.N, Katia, A. Lecointre, M. Regueiro-Figeroa, C. Platas-Iglesias, L.J. Charbonnière, *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 1689.

⁸⁰ M. Stark, R. Ziessel, *DaltonTrans.*, **2012**, 41, 13298.

⁸¹ R. Ziessel, M. Stark, A. Sutter, *PTC Int. WO 2013041811*, **2013**.

⁸² L. Charbonnière, C. Christine, A. Lecointre, K. Nchimi Nono, *PTC Int.*, WO 2012172271, **2012**.

⁸³ E. Brunet, O. Juanes, R. Sedano, J.C. Rodríguez-Ubis, *Org. Lett.*, **2002**, 4, 213.

⁸⁴ E. Brunet, O. Juanes, R. Sedano, J.C. Rodríguez-Ubis, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 6757.

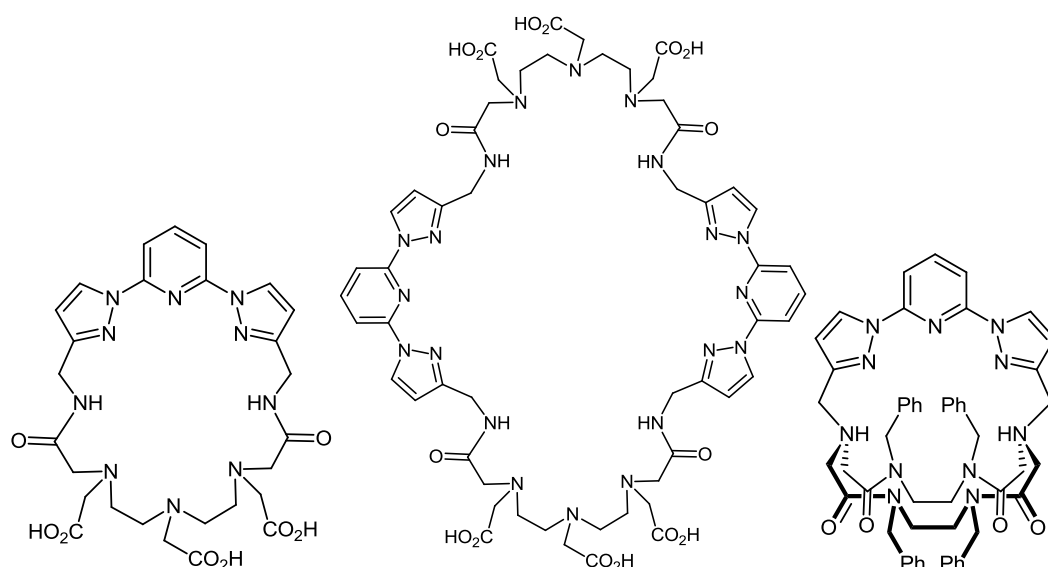


Figura 1.18. Ligandos macrocíclicos sintetizados por nuestro grupo de investigación.

Este trabajo recoge la aproximación llevada a cabo por nuestro grupo de investigación en el que se utilizan diferentes ligandos con estructuras tipo bispirazolilpiridina (1-bpp) y indazolilpirazolilpiridina (1-ipp) en los que se utilizan diferentes éteres corona como ligandos no luminiscentes, que actúan como portadores del ion lantánido.

1.3. Materiales derivados de bispirazolipiridinas

Como ya ha sido puesto de manifiesto, la aparición de productos de partida que permiten una mayor funcionalización de la piridina, está ampliando el interés de numerosos autores, que están dirigiendo sus esfuerzos a la síntesis de materiales supramoleculares luminiscentes que combinan las propiedades quelantes de la bispirazolipiridina junto con la rigidez que aportan los anillos pirazol y piridina a la molécula.⁸⁵ La derivatización en la posición cuatro del anillo de piridina que se desarrolla según se ha descrito anteriormente permite incorporar diferentes funcionalizaciones, pudiéndose obtener estructuras, que actúen como unidades estructurales en la síntesis de materiales moleculares orgánicos MOFs (Molecular Organic-Frameworks). Estas unidades se pueden autoensamblar mediante interacciones supramoleculares (figura 1.16) (interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno, coordinación y apilamiento π - π). Algunas de las estructuras propuestas se recogen en la figura 1.15.

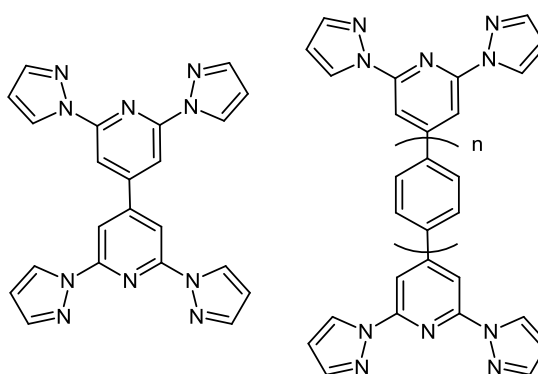


Figura 1.19

Pese a que los MOF's llevan décadas desarrollándose, el uso de este tipo de estructuras derivadas de la bispirazolipiridina comenzó a ser explotado en los últimos años, tal y como puede verse en la literatura.^{86,87,88}

⁸⁵ S. Basak, R. Chandrasekar. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, 21, 667.

⁸⁶ M. Cavallini, I. Bergenti, S. Milita, J.C. Kengne, D. Gentili, G. Ruani, I. Salitros, V. Meded, M. Ruben, *Langmuir*, **2011**, 27, 4076.

⁸⁷ M.S. Alam, M. Stocker, K. Gieb, P. Müller, M. Haryono, K. Student, A. Grohmann. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2010**, 49, 1159.

⁸⁸ J.M. Stanley, B.J. Holliday. *Polym. Prep (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)*, **2011**, 52, 769.

La rigidez y conjugación de este tipo de estructuras poliheteroaromáticas facilitan su ensamblaje formando capas (Figura 1.20),⁸⁹ nanotubos,⁸⁵ polímeros,⁹⁰ etc.

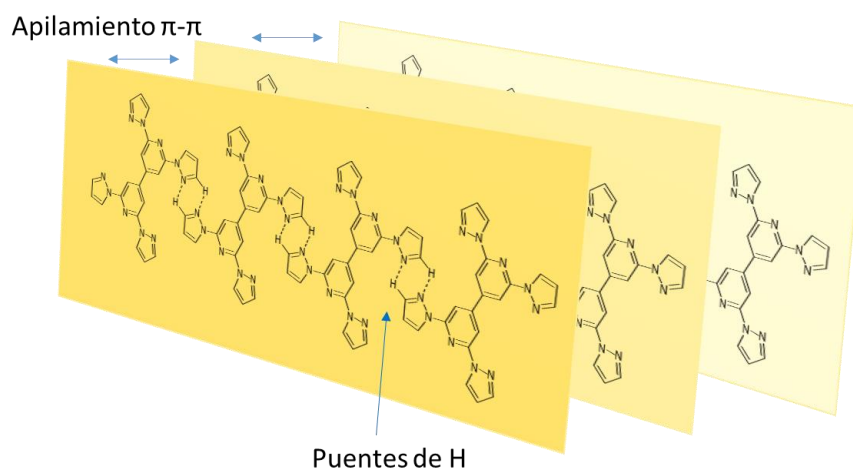


Figura 1.20

Las buenas propiedades complejantes de este tipo de estructuras permiten formar complejos con iones lantánidos para formar materiales luminiscentes.⁹¹ Las propiedades luminiscentes de estos materiales están permitiendo su uso como termómetros,⁹² sensores⁹³ y materiales autoreparables⁹⁴ luminiscentes entre otros usos.

Debido a la demanda que actualmente hay por conseguir nuevos y mejorados materiales, en este trabajo se aborda la síntesis y estudio preliminar de este tipo de materiales moleculares orgánicos (MOF's). Para lo cual nos centraremos en la síntesis y diseño de materiales híbridos que combinen las estructuras poliheteroaromáticas preparadas con iones lantánidos, comúnmente conocidos como LnMOF's (Lanthanide Metal-Organic Frameworks).

⁸⁹ N. Chandrasekar, R. Chandrasekar, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 2915.

⁹⁰ S. Basak, P. Hui, S. Boodida, R. Chandrasekar. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 3620.; S. Basak, Y. Narayana, M. Baumgarten. K. Müllen, R. Chandrasekar. *Macromolecules*, **2013**, 46, 362.

⁹¹ Y. Narayana, R. Chandrasekar. *ChemPhysChem* **2011**, 12, 2391.

⁹² X. Rao, T. Song, J. Gao, Y. Cui, Y. Yang, C. Wu, B. Chen, G. Qian. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 15559.

⁹³ S. Dang, X. Min, W. Yang, F. Yi, H. You, Z. Sun, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 17172.

⁹⁴ M. Martinez-Calvo, O. Kotova, M. Möbius, A. Bell, T. McCabe, J. Boland, T. Gunnlaugsson. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 1983.

2. Objetivos

*“Las grandes mentes tienen objetivos,
las demás deseos”*

Washington Irving.

Como se ha mostrado en la introducción, la importancia de los ligandos con esqueletos poliheterocíclicos, y más concretamente los de bispirazolilpiridina y bisindazolilpiridina, es cada día mayor, debido a las buenas propiedades complejantes de iones metálicos y sus aplicaciones en multitud de campos.

En este contexto se plantea esta tesis doctoral, cuyo objetivo es el desarrollo de una metodología sintética que permita abrir las puertas para el acceso a diferentes familias de ligandos capaces de formar complejos con iones lantánidos, cuyas propiedades luminiscentes se pretenden aplicar en ensayos biomédicos y en la preparación de materiales luminiscentes.

En concreto se plantean los siguientes objetivos:

- I. La preparación de ligandos antena basados en esqueletos poliheterocíclicos derivados de pirazolpiridina. Se estudiarán las propiedades fotofísicas de sus complejos con iones lantánidos, para poder evaluar su aplicación como sondas luminiscentes en la detección de ADN bacteriano.

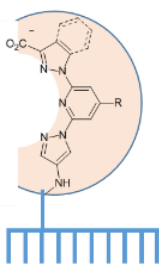


Figura 2.1

- II. La síntesis de nuevos ligandos tetracarboxílicos y el estudio de las propiedades fotofísicas de sus complejos con iones lantánidos. La versatilidad de la síntesis de piridinas disustituidas, que se describe en esta memoria, permite el desarrollo de una nueva generación de marcadores luminiscentes de este tipo, que amplía la existente y permite una comparación y estudio de la influencia de los sustituyentes sobre la piridina en la emisión de los complejos de lantánidos y su disponibilidad para ampliar el número de estructuras disponibles en el campo del diagnóstico clínico.

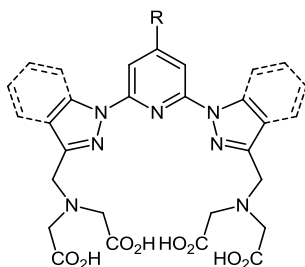


Figura 2.2

- III. La preparación de estructuras poliheterocíclicas de piridina, pirazol e indazol funcionalizadas con grupos ácido carboxílico que se puedan emplear como unidades estructurales en la preparación de materiales híbridos luminiscentes (MOF's) basados en iones lantánidos.

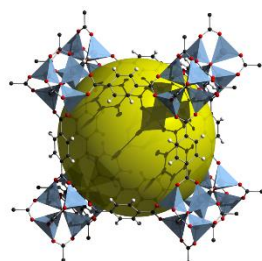


Figura 2.3

Con estas premisas, pasaremos a detallar los tres objetivos mencionados.

- I. Desarrollo de una nueva metodología sintética para la obtención de ligandos antena basados en esqueletos heterocíclicos y su aplicación como sondas luminiscentes en la detección de ADN bacteriano.

Este primer objetivo es el núcleo de esta tesis y a partir del que, a la vista de los resultados, se ha ampliado a los dos restantes de la memoria.

Este objetivo se enmarca dentro de un proyecto Europeo (ACUSEP) 95 en el que nuestro grupo ha participado y cuyo objetivo final es el desarrollo de un test de detección de las diferentes bacterias responsables de la sepsis, más rápido y eficaz, que los usados hasta el momento, y que sea capaz de intentar asegurar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por este tipo de patología de origen bacteriano.

La sepsis representa una importante preocupación en el área médica (un 9% de los pacientes con sepsis progresan a sepsis severa y el 3% de éstas evolucionan a shock séptico),⁹⁶ además su impacto en los gastos de cuidados intensivos es muy alto. Cada año, en todo el mundo, se producen alrededor de 18 millones de casos de sepsis grave y se prevé un aumento debido principalmente a la creciente utilización de procedimientos médicos invasivos y al aumento de la esperanza de vida, así como un mayor número de individuos de alto riesgo, como los pacientes oncológicos y con VIH. La sepsis es una enfermedad grave que causa en torno a 135.000 muertes al año en

⁹⁵ Proyecto ACUSEP (Integrated whole blood acoustophoresis and homogeneous nucleic acid detection cartridge for rapid sepsis diagnostics) (7º Programa Marco de la U.E., área de salud) Grant no 259848.

⁹⁶ M. P. Rodrigo Casanova, J. M. García Peña, V. Rodríguez, M. Ortega, L. Aguilera Celorrio, *Rev. Esp. Anestesiología y Reanimación*, **2007**, 54, 484.

Europa, ocupando tristemente el segundo puesto en el ranking de mortalidad hospitalaria después de las afecciones cardíacas.

En la sepsis, la cantidad de carga bacteriana en el torrente sanguíneo es 1-300 cfu/mL,⁹⁷ por lo que es difícil de detectar directamente. Por lo tanto, los nuevos métodos de detección molecular se basan en la amplificación de la muestra de sangre de una forma aislada y enriquecida por el ácido nucleico del agente bacteriano que la causa. Estas pruebas tienen un gran potencial porque acortan el diagnóstico y mejoran el cuidado de sepsis clínica, ya que resultan ser más independientes del tratamiento antibiótico previo o de las condiciones de cultivo del organismo causante.

Durante los últimos 15 años, ha habido un progreso notable en el análisis y la manipulación de ADN y su uso en la nanotecnología. El análisis de ADN se realiza en biología molecular, diagnósticos médicos, y medicina forense.

Gran parte de esta tecnología, que está basada en la detección de fluorescencia y luminiscencia de lantánidos, está tomando un papel principal en este campo de investigación.

La Figura 2.4 muestra un formato de ensayo de hibridación de ADN homogéneo basado en la formación de los complejos luminiscentes de Eu(III) y Tb(III) mediante la aproximación de un ligando antena (AL) y un quelato portador de iones (ICC).

Como ya se ha comentado anteriormente y según puede observarse en la figura, el mecanismo consiste en que la sonda oligonucleótido marcada con el lantánido (Ln) no es fluorescente, al igual que la sonda marcada con un cromóforo que actúa de antena.

Cuando se produce la hibridación de ambos oligonucleótidos sobre el “oligo-target”, se induce la formación de un quelato mixto que resulta ser altamente fluorescente. Las posiciones vacantes de coordinación en ICC se complementan con la coordinación a AL formando los complejos luminiscentes, que revelan la existencia de una secuencia de ADN complementaria a la secuencia de los oligonucleótidos marcados con el AL y el ICC.

⁹⁷ K. Y. Y. Chan, A.K. Chan, K. Li, T.F. Fok, P.C. Ng., *Crit. Care Med.*, **2009**, 37, 2441.

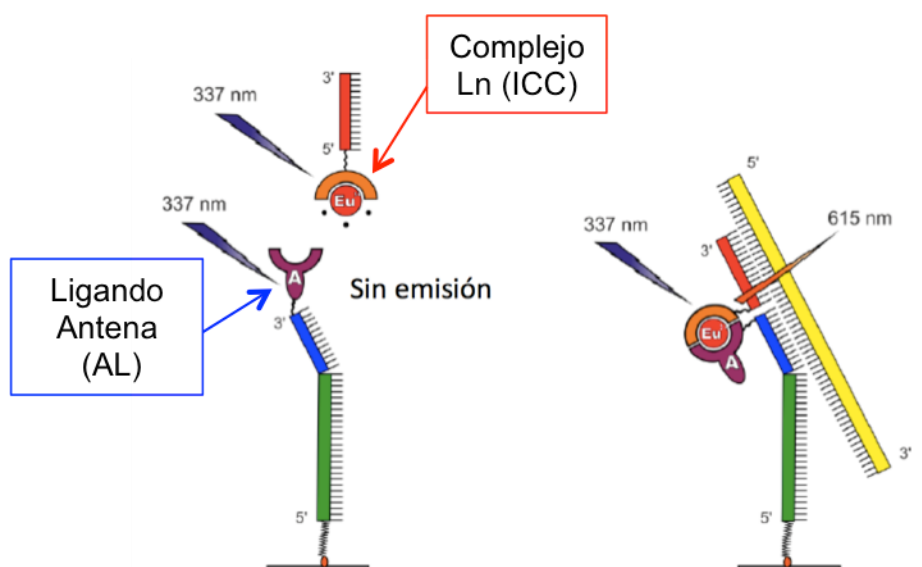


Figura 2.4.- Método de complementariedad en la técnica de doble marcaje del ensayo homogéneo de oligonucleótidos

Es en este contexto, en el que este proyecto de tesis pretende aportar soluciones en forma de la preparación de nuevos ligandos antena que sean capaces de actuar como sensibilizadores de los iones lantánidos, para el marcaje de los oligonucleótidos de las bacterias causantes de sepsis.

El procedimiento del ensayo típicamente se compone de cuatro etapas (Figura 2.5): 1) cultivo para enriquecer de bacterias la sangre a estudiar; 2) concentración y aislamiento del material genético; 3) amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) de amplia gama; y 4) identificación post-PCR de los genes del agente bacteriano y resistentes a los antibióticos mediante técnicas de secuenciación.^{98,99}

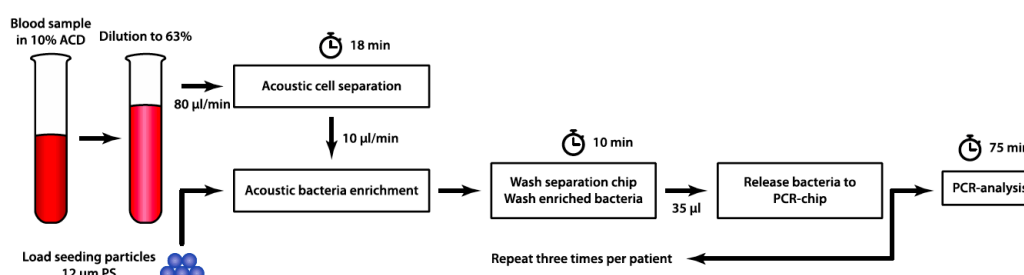


Figura 2.5.- Protocolo del proyecto ACUSEP para la determinación de la sepsis

⁹⁸ H. Westh, G. Lisby, F. Breyse, B. Böddinghaus, M. Chomarat, V. Grant, A. Goglio, A. Raglio, H. Schusterm F. Stuber, H. Wissing, A. Hoeft, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2009**, 15, 544.

⁹⁹ N. Wellinghausen, A.-J. Kochem, C. Disqué, H. Mühi, S. Gebert, J. Winter, J. Matten, S.G. Sakka., *J. Clin. Microbiol.*, **2009**, 47, 2759.

Con el método de complementariedad o método basado en los interruptores moleculares, las características luminiscentes del ion captador de la luz y del ion portador se separan en dos mitades distintas, que son no fluorescentes de manera independiente, pero que mediante su adecuada combinación se puede formar un complejo altamente fluorescente. El marcaje puede darse en los extremos 3' y 5' de las sondas de los oligonucleótidos que serían complementarios a la secuencia amplificada, propia de cada especie de organismo que causa la sepsis y cuya detección se busca.

Las principales ventajas de esta técnica de doble marcaje es la generación de una señal altamente específica que puede diversificarse empleando varios lantánidos diferentes y la excelente sensibilidad en el diagnóstico de secuencias de ADN específicas y diferentes de modo simultáneo.

Los requisitos para llevar a cabo el objetivo final se pueden describir en tres grupos.

i. Preparación de Ligandos Antena (Antenna Ligand, AL).

La síntesis de nuevos ligandos antena nos proporcionará información sobre la influencia ejercida por la introducción de nuevos centros cromóforos en la actividad luminiscente del ligando respecto a los ya descritos.

Se desarrollará una metodología sintética que permita obtener dos familias de ligandos antenas, que contengan grupos quelantes, como ácidos carboxílicos, y grupos funcionales que permitan su unión covalente con oligonucleótidos, como grupos isotiocianato. Ambas familias de ligandos presentan una estructura poliheterocíclica, derivada de la bispirazolilpiridina y de la indazolilpirazolilpiridina (Figura 2.6).

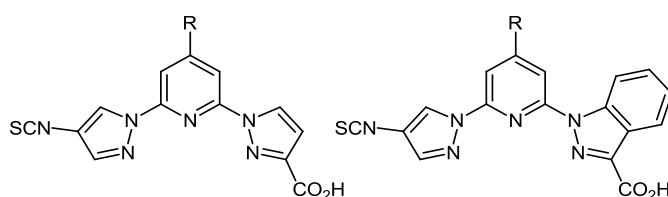


Figura 2.6

En estos ligandos se modificará la estructura de la unidad cromófora, en posición del anillo de piridina, con objeto de estudiar las propiedades fotofísicas de sus complejos con iones lantánidos luminiscentes.

ii. Estudios fotofísicos en disolución

Dado que los ligandos cuya síntesis se pretende abordar no presentan un número suficiente de posiciones de coordinación que permitan la obtención de complejos de

lantánidos estables, no es posible conocer sus propiedades de sensibilización directas hasta su conjugación e hibridación sobre oligonucleótidos. Este proceso resulta inviable con todas las estructuras a preparar por cuestiones económicas y de desarrollo temporal. Por consiguiente un objetivo ligado a la preparación de estos ligandos antena es el estudio de sus propiedades de sensibilización hacia estos iones mediante la formación de complejos ternarios, en los cuales los iones lantánidos serán portados por quelatos orgánicos de tipo éter corona, de esta manera se disminuyen diferentes efectos no deseados como la autofluorescencia o la competencia de complejos con diferente estequiometría.

El estudio de la actividad fotoluminiscente de estos nuevos ligandos nos proporcionará información sobre la influencia ejercida por la introducción de los diferentes centros cromóforos, antes de su aplicación en los bioensayos (Figura 2.7)

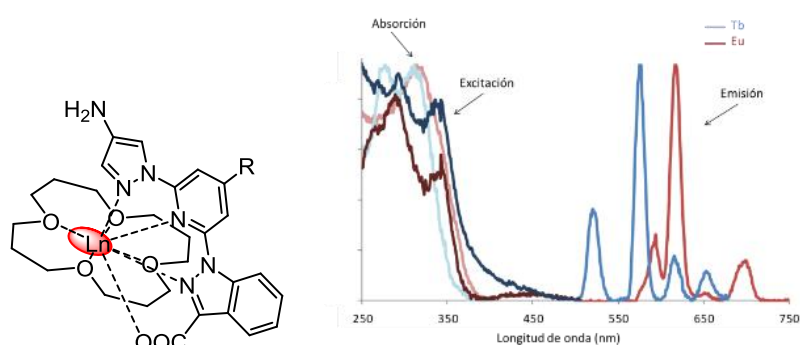


Figura 2.7.

iii. Aplicación en bioensayos

Se realizarán las reacciones de conjugación de los ligandos antenas y los quelatos portadores de iones con los correspondientes oligonucleótidos, mediante la formación de un enlace covalente entre el grupo isotiocianato de los ligandos y el grupo amino del oligonucleótido. Estos oligonucleótidos se hibridarán a diferentes hebras de ADN bacteriano complementario para evaluar su actividad como detectores de bacterias (Figura 2.8).

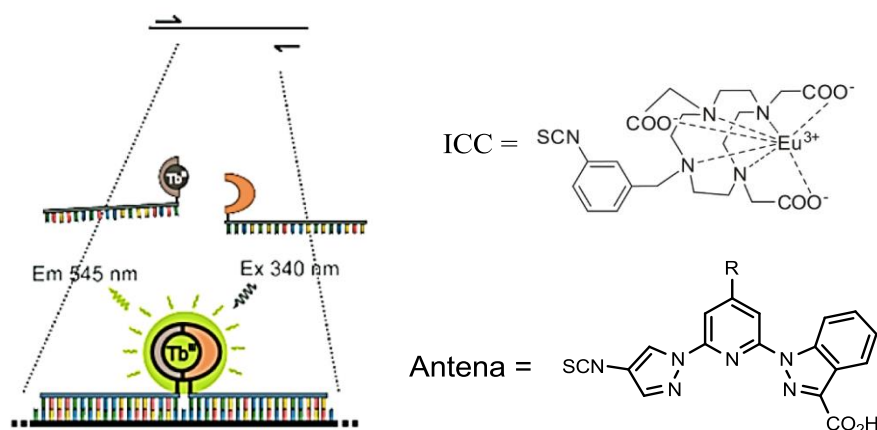


Figura 2.8

II. La síntesis de nuevos ligandos tetracarboxílicos y el estudio de las propiedades fotofísicas de sus complejos con iones lantánidos.

El segundo objetivo de esta tesis, el desarrollo de ligandos nonadentados derivados de la bispirazolilpiridina, continúa una línea investigación de la que nuestro grupo fue pionero, con la síntesis del ácido *N,N,N',N'*-[2,6-(3-aminometil-1-pirazolil)]piridina tetraacético (Figura 2.9).

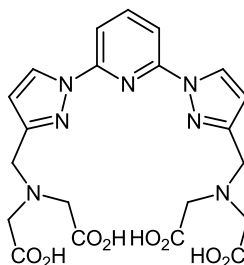


Figura 2.9.

Este ligando, está formado por un cromóforo basado en el sistema bispirazolilpiridina (1-bpp) y por dos unidades de ácido iminodiacético, las cuales actúan como agentes complejantes, además de aislar al metal de forma efectiva del medio. Este ligando presenta buenos rendimientos cuánticos para sus complejos de Eu, y sobre todo para los de Tb.¹⁰⁰

La vía abierta a la síntesis de nuevos ligandos de piridina disustituídas en posiciones 2 y 6 en la que la posición 4-bromo queda disponible a la introducción de casi cualquier cromóforo aromático, nos planteó la síntesis de este tipo ligandos sustituidos en la

¹⁰⁰ Rosa Sedano *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Madrid, Diciembre 2001.

posición 4 de la piridina, para el estudio de los efectos que este sustituyente presenta sobre la luminiscencia de los complejos y la ampliación a una nueva generación de marcadores luminiscentes y su aplicación en el campo del diagnóstico clínico.

El objetivo de este capítulo se puede dividir en dos partes.

i. Preparación de ligados polidentados derivados de la bispirazolil y bisindazolil piridina.

Se sintetizarán diferentes ligandos derivados del del ácido N,N,N',N' -[2,6-(3-aminometil-1-pirazolil)]piridina tetraacético, en los que se introducirán diferentes sustituyentes en posición 4 del anillo de piridina mediante reacciones de acoplamiento cruzado via paladio. Asimismo se sintetizará una segunda familia de ligandos en los que se modificará la estructura sustituyendo los anillos de pirazol por anillos de indazol (Figura 2.10).

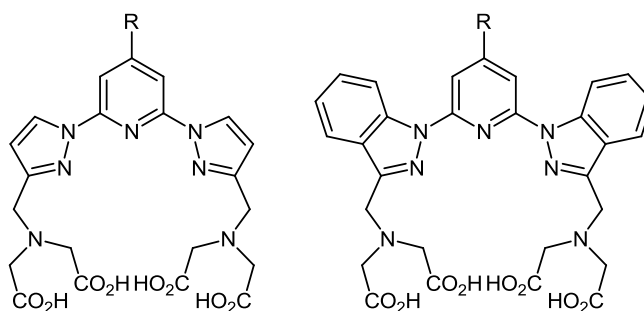


Figura 2.10

ii. Estudio de las propiedades fotofísicas de los ligandos sintetizados

Se estudiará, la influencia de las unidades cromóforas ejercida por la incorporación diferentes sustituyentes en posición 4 del anillo de piridina y para ambos tipos de estructuras, y se estudiarán las propiedades luminiscentes de los complejos formados con iones lantánidos de Europio, Terbio, Samario y Disprosio.

III. Preparación de estructuras poliheterocíclicas de piridina, pirazol e indazol funcionalizadas con grupos ácido carboxílico para la preparación de materiales híbridos luminiscentes (MOF's).

Como último objetivo, contando con la experiencia adquirida en el transcurso de este trabajo en síntesis poliheterocíclica, se plantea el desarrollo de una metodología sintética eficaz para el acceso a unidades estructurales basadas en estos heterociclos que en su forma de ácidos carboxílicos pudieran servir como unidades estructurales para la preparación de materiales de tipo MOF (Metal Organic Frameworks) que en el caso de los híbridos con iones lantánidos daría lugar a MOFs luminiscentes.

La versatilidad sintética de los productos de partida utilizados en los capítulos anteriores, además de su planaridad y propiedades fotofísicas, hace de los esqueletos bispirazolilpiridina y bisindazolilpiridina unos perfectos candidatos para la síntesis de las unidades estructurales que formaran los MOFs. Algunas de las estructuras propuestas y basadas en variaciones sintéticas sencillas de las llevadas a cabo para la preparación de ligandos en los dos anteriores objetivos se presentan en la Figura 2.11.

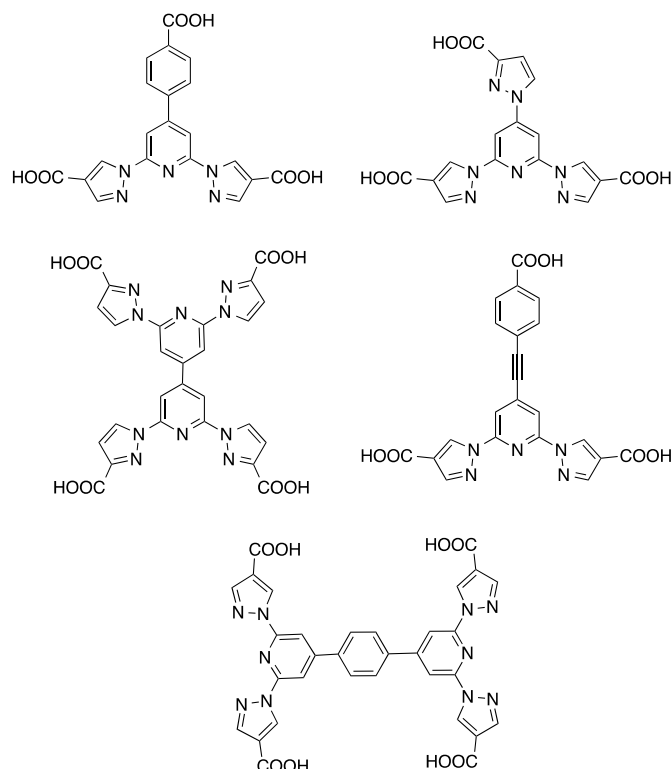


Figura 2.11

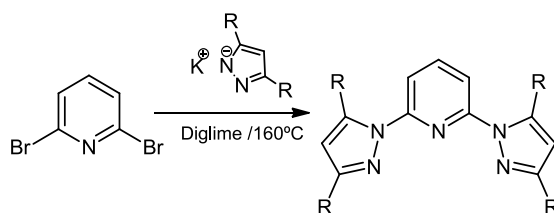
En este sentido en esta tesis se pretende abrir una nueva vía de investigación en nuestro grupo mediante el diseño, síntesis y caracterización preliminar nuevos compuestos y sus complejos con iones lantánidos.

Posteriormente se estudiarán las propiedades de los materiales híbridos obtenidos mediante una síntesis hidrotermal con los correspondientes iones Europio y Terbio.

3. Desarrollo de una nueva metodología sintética para la obtención de ligandos antena basados en esqueletos heterocíclicos y su aplicación como sondas luminiscentes en la detección de ADN bacteriano.

A la vista de los objetivos planteados, el primer reto sintético planteado fue la elección de un sustrato de partida que permitiese la obtención las piridinas trisustituidas deseadas. Los productos de partida empleados para sistemas similares que se hayan descritos y se han empleado hasta la fecha no presentaban las características deseadas para la síntesis de los ligandos planteados este proyecto.

Nuestro grupo de investigación fue pionero en la síntesis de ligandos nonadentados basados en el esqueleto de bispirazolpiridina, utilizando como producto de partida la 2,6-dibromopiridina.¹⁰¹ La reacción, a nivel general, transcurre al hacer reaccionar la 2,6-dibromopiridina, con el correspondiente pirazol en forma de pirazolato potásico, según se recoge en el Esquema 3.1.¹⁰²



Esquema 3.1

Pero, pese a la experiencia adquirida por el grupo de investigación para síntesis de piridininas disustituidas, para la síntesis de piridinas trisustituidas de modo no simétrico, que se plantean como objetivo en esta tesis doctoral, es necesario el uso de un sustrato de partida que permita una fácil discriminación de las posiciones 2 y 6 de la piridina e introducir una funcionalización que permita la variación de sustituyentes sobre la posición 4.

Una exhaustiva revisión bibliográfica reveló que el producto que mejores perspectivas presenta sobre estas exigencias sintéticas es la 4-Bromo-2,6-difluoropiridina. Ésta se sintetizó aprovechando el trabajo desarrollado por Schlosser y col. sobre la regioselectividad de compuestos de piridina polihalogenados,¹⁰³ y más concretamente sobre la 2,4,6-trifluoropiridina, que fue elegida como sustrato de partida.

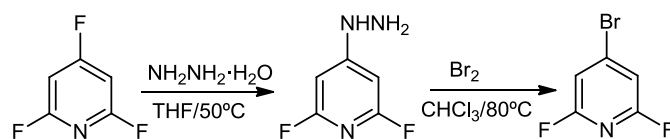
La mayor reactividad de la posición *para* en la 2,4,6-trifluoropiridina, permite introducir la funcionalidad hidrazina en esta posición mediante una sustitución nucleófila aromática. Posteriormente y mediante una reacción Sandmeyer modificada da lugar al

¹⁰¹ a) E. Brunet, O. Juanes, R. Sedano, J.C. Rodríguez-Ubis, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 613; b) M. J. Remuiñán, H. Román, M. T. Alonso, J.-C. Rodríguez-Ubis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1993**, 1099.

¹⁰² D. Jameson, K.A. Goldsby, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4492.

¹⁰³ a) M. Schlosser, C. Bobbio, T. J. Rausis, *Org. Chem.* **2005**, 70, 2494; b) M. Schlosser, T. Rausis, C. Bobbio, *Org. Lett.* **2005**, 7, 127; c) M. Schlosser, T. Rausis, *Helv. Chim. Acta* **2005**, 88, 1240.

precursor funcionalizado con un átomo de Bromo en posición *para* del anillo de piridina (Esquema 3.2).¹⁰⁴



Esquema 3.2

Las tres posiciones susceptibles a modificaciones químicas, hacen de la 4-bromo-2,6-difluoropiridina el producto de partida idóneo para la síntesis de productos más complejos, en los cuales los átomos de flúor pueden ser sustituidos por anillos heterocíclicos NH, como pirazol e indazol, y el átomo de bromo da acceso a la síntesis de productos aril sustituidos por reacciones de acoplamiento. La excelente reactividad de los átomos de flúor sobre su equivalente dibromado, representado en el esquema 3.1, facilita la sustitución nucleófila, por lo que en condiciones más suaves, como las necesarias para la sustitución del flúor has mayores posibilidades de jugar con la selectividad de la reacción y conseguir productos de sustitución de uno o de los dos átomos de flúor.

Para alcanzar los objetivos propuestos la Figura 3.1 muestra las estructuras propuestas como marcadores luminiscentes para ensayos genéticos, que serán presentadas en este capítulo. Como se ha comentado en los objetivos los requisitos que han de tener los ligandos poliheterocíclicos es la presencia de un grupo cromóforo (R) en posición 4 de la piridina, un grupo quelante y un grupo que permita el enlace a oligonucleótidos, como el grupo isotiocianato.

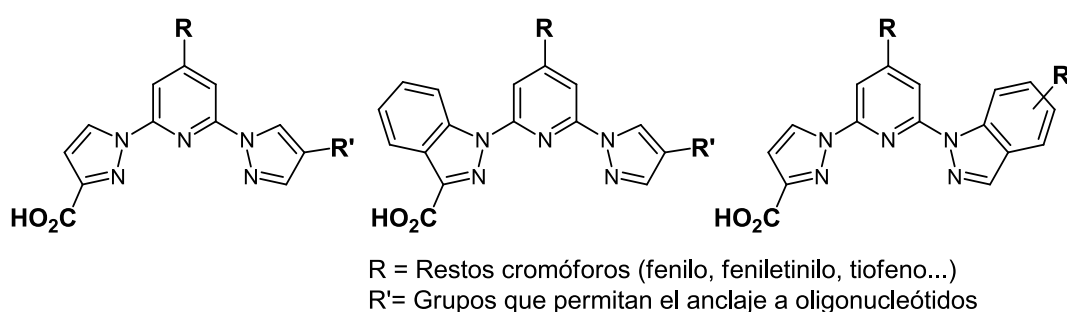


Figura 3.1

¹⁰⁴ D. R. Cefalo, J. I. Henderson, H. H. Mokri (*Frontier Scient. Inc.; Logan, UT*), US-A 7087755, **2006**.

Cabe destacar que la versatilidad y reactividad de este producto de partida, que podría permitir la obtención de un mismo producto final a través de diferentes rutas sintéticas. En la Figura 3.2 se muestra las diferentes vías de sustitución que podemos emplear para llegar al producto final.

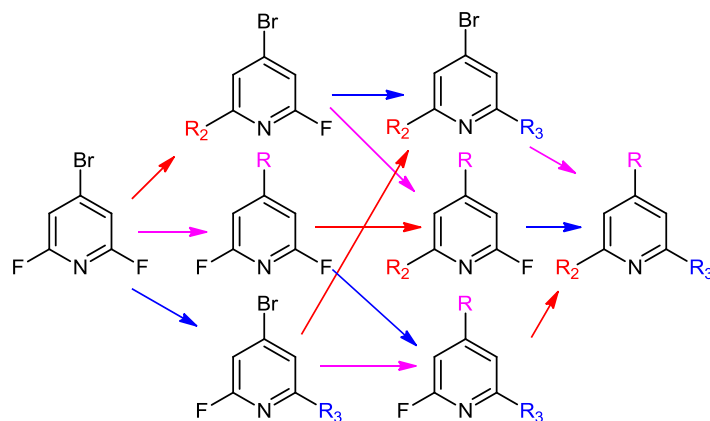


Figura 3.2

Esta versatilidad del producto de partida permite de este modo el acceso a productos intermedios de gran interés para su utilización como ligandos en química de coordinación, que abren nuevas vías de investigación de las que se presentará una de las que se han iniciado y que constituye el tercero de los objetivos de esta memoria.

3.1. Síntesis

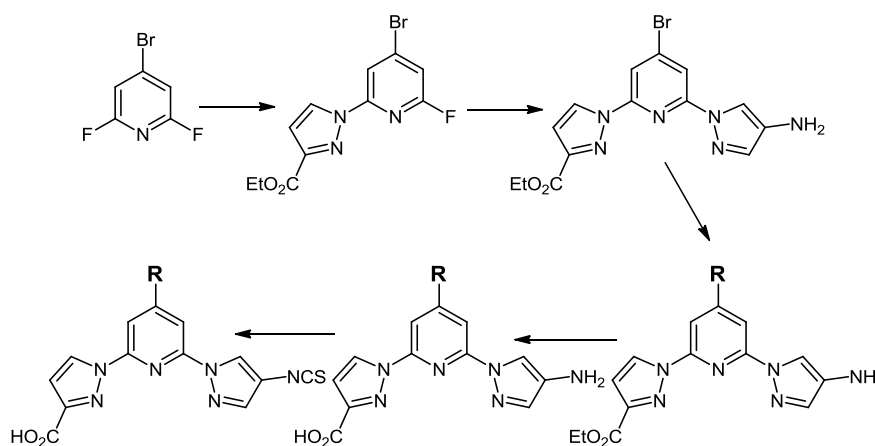
En este capítulo se trata la síntesis de los ligandos con actividad luminiscentes como antenas moleculares derivados del 1-bpp y 1-ipp, en los que se varia la unidad cromófora.

3.1.1. Síntesis de Ligandos asimétricos derivados del 1-bpp, para su uso como sondas luminiscentes.

Con el objetivo de sintetizar ligandos derivados de bispirazolilpiridinas, con pirazoles con distintos sustituyentes, se propuso la secuencia presentada en el Esquema 3.3.

Los ligandos antena fueron sintetizados a partir de la difluorobromopiridina. Como se comentó en los objetivos, estos ligandos han de contar con grupos carboxilato, que actuaran como grupos quelantes, y han de llevar un grupo funcional que permita unión mediante un enlace covalente al oligonucleótido elegido, para ello se eligió el grupo isotiocianato, lo cual permitirá su aplicación como sondas luminiscentes.

La ruta sintética comienza utilizando la 4-bromo-2-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-6-fluoropiridina (**1**) como producto de partida.

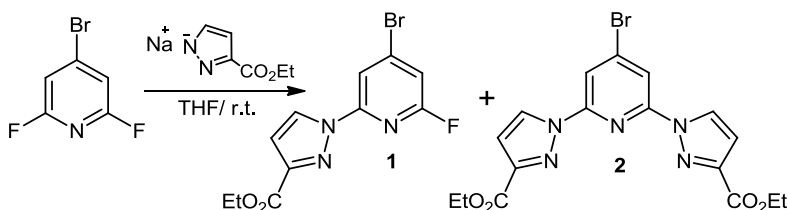


Esquema 3.3

La optimización de la síntesis del 4-bromo-2-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-6-fluoropiridina (**1**) fue llevada a cabo utilizando hidruro sódico en THF a temperatura ambiente, unas condiciones más suaves que las encontradas en la literatura para el acceso a derivados sustituidos.¹⁰⁵ La sal sódica del 3-etoxicarbonilpirazol se genera

¹⁰⁵ M. Stark, P. Kadjane, E. Bois, B. Darbouret, A. Incamps, R. Ziessel, L.J. Charbonnière. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9164.

mediante la adición de NaH al 3-etoxicarbonilpirazol en THF a 0°C y a continuación se adiciona sobre la 4-bromo-2,6-difluoropiridina (Esquema 3.4). La reacción se realiza a temperatura ambiente, lo cual permite utilizar THF como disolvente en sustitución de la DMF. Además, el uso de THF como disolvente permite mantener un buen control de la reacción, que origina buenos resultados, aunque no transcurre con formación única del derivado monosustituido buscado **1**, sino que también aparecen cantidades variables del ligando disustituido **2** (10-20%). Ambos productos son fácilmente aislables de la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna de gel de sílice.



Esquema 3.4

Cabe mencionar que el derivado disustituido, aunque se obtiene en buenos rendimientos empleando exceso de sal potásica del pirazol, servirá también como producto de partida para preparar los ligandos nonadentados derivados del ácido iminodiacético que se describirán en el Capítulo 4.

Es importante señalar que aunque la utilización de pirazoles asimétricamente sustituidos implica el riesgo de obtener mezclas de regioisómeros debido a la tautomería del anillo de pirazol y el posible ataque de cualquiera de los nitrógenos pirazólicos sobre la piridina, solo se obtienen los derivados **1** y **2** exclusivamente. La obtención de un único regioisómero podría explicarse por efectos estéricos y electrostáticos del grupo etoxicarbonilo en posición 3 del anillo de pirazol.

Como se muestra en la Figura 3.3, la formación del anión pirazolato en el átomo de nitrógeno contiguo al grupo éster, esta desfavorecida, tanto por un factor estérico como por un factor electrostático, debido a la repulsión entre los pares de electrones del átomo de oxígeno carbonílico y la carga sobre el átomo de nitrógeno. Esto justifica la formación exclusiva del producto de *N*-alquilación sobre el nitrógeno 1, cuyo anión está mucho más favorecido.

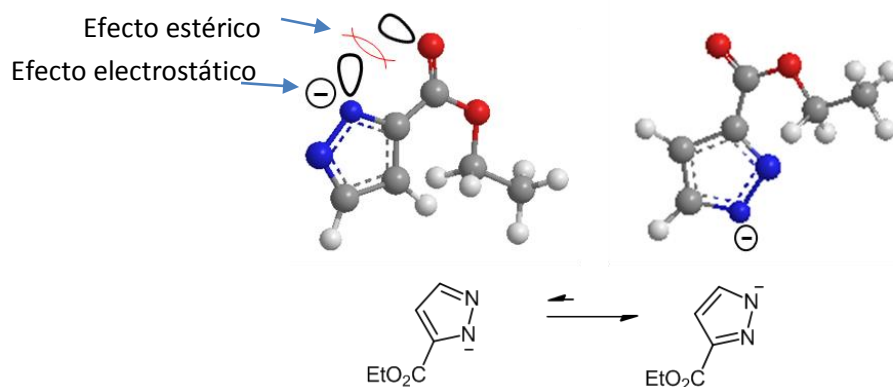
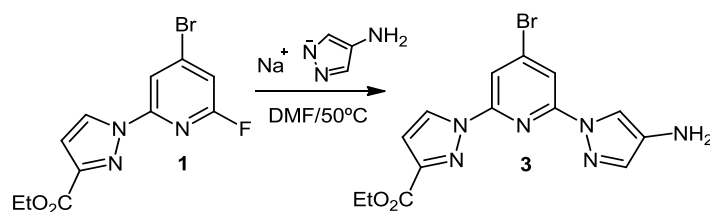


Figura 3.3 Tautómeros posibles del anión de 3-etoxicarbonilpirazolato

La regioselectividad de esta reacción de sustitución fue corroborada mediante resonancia magnética. El acoplamiento de los protones 4 y 5 del pirazol en el espectro de ^1H -RMN es el típico para la regioquímica indicada lo que confirma que la regioselectividad es 1,3. Asimismo, el espectro de **1** muestra claramente la presencia de asimetría en la estructura, en la que sólo se produce la sustitución de uno de los átomos de flúor. En el espectro se aprecia la existencia del átomo de flúor por el acoplamiento de éste con el protón piridínico vecinal. Asimismo, en el espectro de ^{13}C -RMN, la señal más evidente de que el producto es el esperado, es la aparición de un doblete para el átomo de carbono que se encuentra unido al átomo de flúor.

Siguiendo el esquema sintético propuesto, en una segunda etapa, se lleva a cabo la sustitución del segundo átomo de flúor, por el anillo de 4-aminopirazol, utilizando condiciones de reacción más enérgicas a las empleadas para la introducción del primero de los anillos de pirazol en el compuesto **1**, así la reacción requiere mayor temperatura y el empleo de DMF como disolvente en lugar de THF. La 4-bromo-2-(3-etoxicarbonilpirazolil)-6-aminopirazolilpiridina (**3**) se obtuvo con rendimientos moderados (41%), tras purificación cromatográfica (Esquema 3.5).

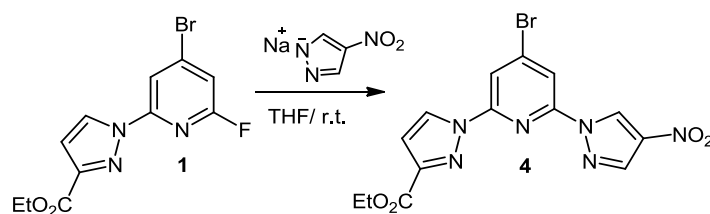


Esquema 3.5

La utilización de pirazoles con sustituyentes en posición 4, como el 4-amino empleado no conlleva problemas de regioisomería, ya que ambos tautómeros son equivalentes.

Los rendimientos obtenidos en la reacción, junto al coste económico del pirazol de partida, hicieron necesario la optimización de esta etapa mediante el empleo de otros pirazoles a partir de los cuales fuera posible también llegar hasta el grupo amino presente en **3** y que es el grupo que permite su transformación en un grupo isotiocianato.

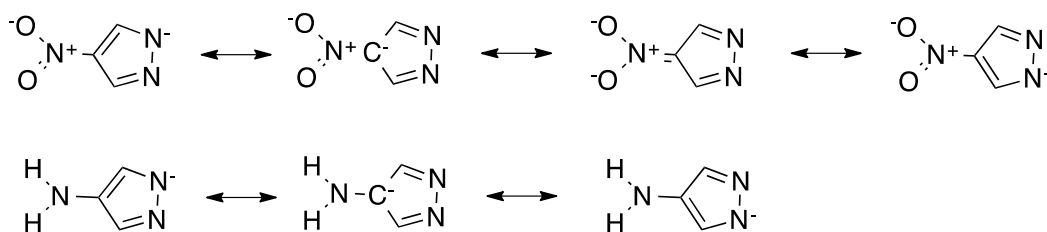
Por este motivo, se utilizó el 4-nitropirazol como precursor del 4-aminopirazol. La sustitución del átomo de flúor por el anillo de 4-nitropirazol, empleando, de nuevo, hidruro sódico como base en THF a temperatura ambiente, condujo a la 4-bromo-2-(3-etoxycarbonilpirazolil)-6-(4-nitropirazolil)piridina (**4**) con un rendimiento del 90% (Esquema 3.6).



Esquema 3.6

La estructura puede determinarse inequívocamente por espectroscopía de ^1H -RMN por la aparición de las dos señales pirazolicas no acopladas entre sí a 9.19 y 8.30 ppm.

A priori, cabe pensar que la naturaleza electrón-atrayente del grupo nitro aumenta la acidez de este pirazol ya que favorece la deslocalización de la carga del pirazolato (Esquema 3.7), en consecuencia debería de ser menos reactivo que el 4-aminopirazol.



Esquema 3.7 Formas resonantes del 4-nitropirazol y 4-aminopirazol

Sin embargo, asumiendo la formación de un estado de transición en el que la formación del nuevo enlace entre el átomo de nitrógeno del pirazol y el átomo de carbono de la piridina unido al átomo de flúor se estabiliza por la interacción estabilizante del átomo de sodio con los átomos de nitrógeno de los anillos de piridina y pirazol (Figura 3.4), la posición de este estado de transición debe de variar en función de las características que el pirazol empleado aporta a la deslocalización de carga en este estado.

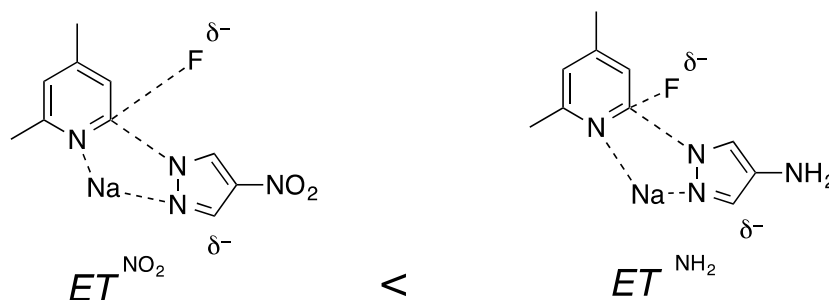
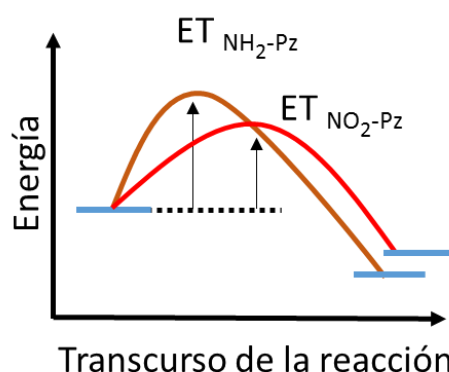


Figura 3.4

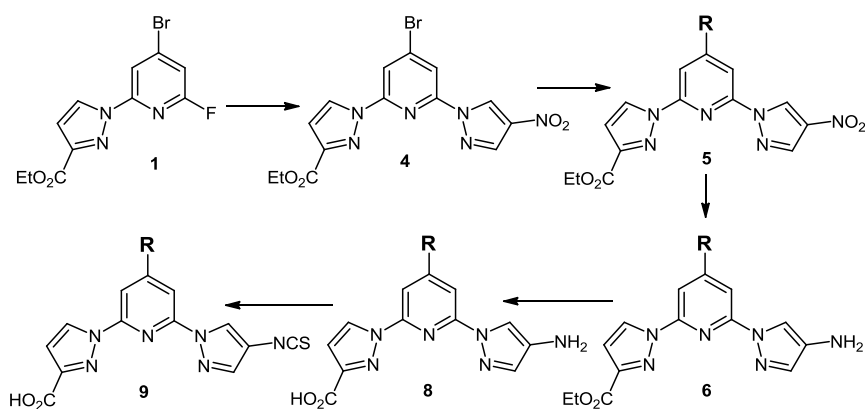
En este sentido en la primera representación el grupo nitro aporta una mayor deslocalización de carga en el estado de transición cuando se compara con el grupo amino. Esta situación favorece un mayor avance de este estado hacia el producto final que se ve favorecido por una interacción del sodio entre ambos nitrógenos (Gráfica 3.1). El grupo amino, sin embargo al ser una base más dura retrasa el estado de transición provocando una situación energética desfavorable que confirma lo observado experimentalmente cuyas condiciones exigen de más temperatura, produciendo menores rendimientos.¹⁰⁶



Gráfica 3.1

Sobre la base de los resultados obtenidos en la reacción sustitución del segundo átomo de flúor, se estableció como ruta sintética a seguir para la síntesis de esta familia de ligandos derivados de la bispirazolilpiridina, la descrita en el Esquema 3.8. De esta manera la sustitución nucleófila del átomo de flúor de la 4-bromo-2-fluor-6-(3-etoxycarbonilpirazol) piridina por el 4-nitropirazol permite la obtención de 4-bromo-2-(3-etoxycarbonilpirazolil)-6-(4-nitropirazolil) piridina.

¹⁰⁶ G. S. Hammond. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 334.



Esquema 3.8

La presencia del átomo de bromo en la 4-bromo-2-(3-etoxycarbonilpirazolil)-6-(4-nitropirazolil)piridina (**4**), permite que se lleven a cabo las reacciones de acoplamiento C-C de Suzuki-Miyaura¹⁰⁷ y Sonogashira,¹⁰⁸ con los ácidos arilborónicos, y arilacetilenos elegidos como sustituyentes para nuestros ligandos (Figura 3.5). Si bien, al principio las reacciones de acoplamiento se realizaron según el método clásico que emplea largos tiempos de reacción a reflujo de THF, este proceso se optimizó para llevarlo a cabo mediante microondas, lo cual permite aumentar la temperatura al hacerse en reactores sellados lo que implica una drástica reducción del tiempo de reacción. Estas modificaciones no afectan al rendimiento aunque si a la rapidez del proceso.

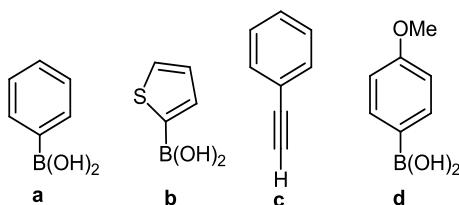


Figura 3.5

A la hora de poner a punto una reacción en el microondas es necesario controlar varios parámetros, como la polaridad del disolvente, la temperatura o el tiempo de reacción.

Los disolventes interaccionan de forma muy diferente con las microondas según su polaridad y propiedades iónicas. En general, los disolventes muy polares como del DMSO, Metanol, Etanol y DMF funcionan muy bien en la síntesis con microondas. Sin

¹⁰⁷ a) N. Miyaura, K. Yamada, A. Suzuki, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 3437. b) N. Miyaura, A. Suzuki, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1979**, 866. c) N. Miyaura, T. Yano, A. Suzuki, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 2865. d) N. Miyaura, T. Yanagi, A. Suzuki, *Synth. Commun.*, **1981**, 11, 513. e) N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 2457.

¹⁰⁸ K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara. *Tetrahedron Letters*, **1975**, 16, 4467.

embargo, los disolventes apolares, como en nuestro caso el THF, pueden calentarse de forma más eficiente si la mezcla de reacción contiene reactivos polares o iones

El tiempo de reacción y la temperatura se relacionan mediante la Tabla 3.1 que está basada en la ecuación de Arrhenius,¹⁰⁹ teniendo en cuenta que un aumento de 10 grados en la temperatura de reacción aumenta al doble la velocidad de ésta. En esta tabla, cada cambio de color supone un cambio en las unidades (horas, minutos, segundos...).

Temp	Tiempos de reacción									
20	1	2	4	6	8	12	24	48	96	172
30	30	1	2	3	4	6	12	24	48	86
40	15	30	1	1.5	2	3	6	12	24	43
50	8	15	30	45	1	2	3	6	12	22
60	4	8	15	23	30	45	1.5	3	6	11
70	2	4	8	11	15	23	45	1.5	3	5
80	56	2	4	6	8	11	23	45	1.5	3
90	28	56	2	3	4	6	11	23	45	11
100	14	28	56	1.4	2	3	6	11	23	40
110	7	14	28	42	56	1.4	3	6	11	20
120	4	7	14	21	28	42	1.4	3	6	10
130	2	4	7	11	14	21	42	1.4	3	5
140	53	2	4	5	7	11	21	42	1.4	3
150	26	53	2	3	4	5	11	21	42	1
160	13	26	53	1	2	3	5	11	21	38
170	7	13	26	40	53	1	3	5	11	19
180	3	7	13	20	26	40	1	3	5	9
190	1.6	3	7	10	13	20	40	1	3	5
200	49	1.6	3	5	7	10	20	40	1	2
210	25	49	2	2	3	5	10	20	40	1
220	12	25	49	1	1.6	2	5	10	20	35
230	6	12	25	37	49	1	2	5	10	18
240	3	6	12	19	25	37	1	2	5	9
250	2	319	6	9	12	19	37	1	2	4

Tabla 3.1 Tabla de conversión de Temperaturas y tiempos utilizando radiación microondas

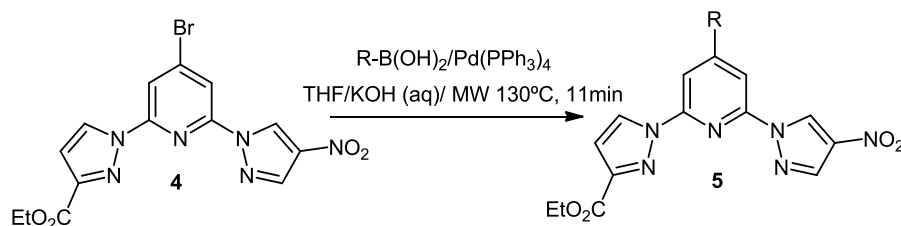
Para la reacción de Suzuki se emplean diferentes ácidos arilborónicos, según las condiciones mostradas en el Esquema 3.9.

Los productos obtenidos son caracterizados por espectroscopia de ^1H -RMN, en cuyos espectros aparecen las señales características de los anillos aromáticos introducidos. En el caso del ligando **5a** aparecen dos grupos de multipletes (7.84-7.81 ppm 2H y 7.55-7.53 ppm 3H) para los cinco protones aromáticos presentes en la estructura.

En el caso del ligando **5b** aparecen las tres señales características del anillo de tiofeno, dos dobletes a 8.30 y 7.55 ppm, y un triplete a 7.21 ppm

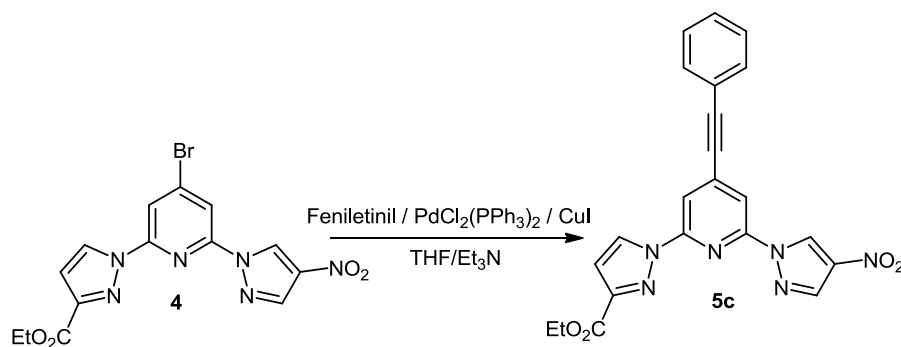
¹⁰⁹ S.A. Arrhenius, *Z. Physik. Chem.* **1889**, 4, 96.

El ligando **5d** presenta dos dobletes, a 7.91 y 7.70ppm, correspondientes a las señales del anillo aromático además de un singlete, a 3.81 ppm correspondiente al –OMe.



Esquema 3.9

En la reacción de Sonogashira se hace reaccionar el fenilacetileno con el derivado bromado **4** en las condiciones descritas en el Esquema 3.10. Tras la purificación por cromatografía en gel de sílice se obtiene el producto deseado (**5c**). El espectro de ^1H -RMN de este compuesto presenta las señales de los cinco protones aromáticos en dos grupos de multipletes (7.58-7.54 ppm 2H y 7.43-7.37 ppm 3H).



Esquema 3.10

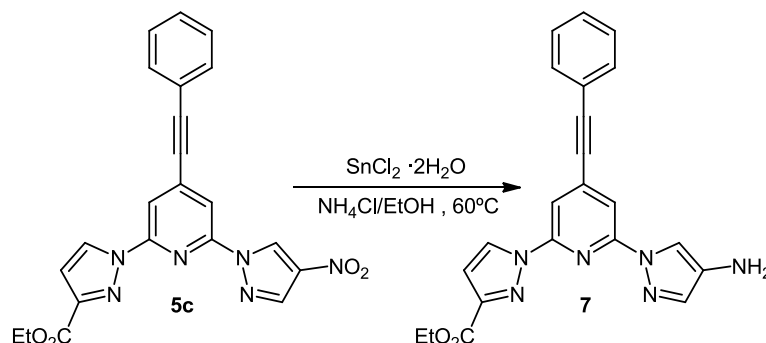
Los rendimientos obtenidos en las reacciones de acoplamiento vía paladio se muestran en la Tabla 3.2.

R	a	b	c	d
Reacción de acoplamiento	60%	53%	80%	48%

Tabla 3.2

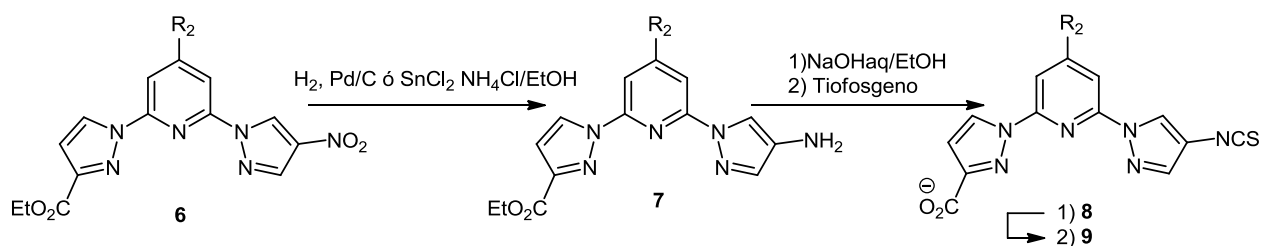
La hidrogenación catalítica del derivado 2-(3-etoxicarbonilpirazolil)-6-(4-nitropirazolil)piridina 4-sustituido con Pd/C da lugar al aminoderivado correspondiente con buenos rendimientos, excepto en el caso del 4-feniletinil derivado, ya que esta hidrogenación catalítica conlleva una reducción parcial del triple enlace.

En este caso para la reducción selectiva del grupo $-\text{NO}_2$ se utiliza en procedimiento descrito por Wang,¹¹⁰ en el que se utiliza cloruro de estaño (SnCl_2) en una mezcla de cloruro amónico en etanol, que permite obtener la amina deseada con buenos rendimientos, sin afectar al triple enlace (Esquema 3.11).



Esquema 3.11

La hidrólisis posterior del grupo éster utilizando las condiciones habituales, NaOH en etanol acuoso, da lugar a las sales sódicas de los ligandos. La adición de tiofosgeno sobre una mezcla de agua/cloroformo que contiene el carboxilato, conduce a la formación del grupo isotiocianato. La presencia del grupo isotiocianato puede ser confirmada fácilmente por la banda característica que aparece en un espectro de IR ($\sim 2100 \text{ cm}^{-1}$) (Esquema 3.12).



Esquema 3.12

¹¹⁰ L. Sun, S. Wang. *Synth.Comm.*, **2007**, 37, 2187.

La Tabla 3.3 muestra los rendimientos obtenidos en las reacciones de reducción, hidrólisis y transformación del grupo amino en isotiocianato representadas en el Esquema 3.12



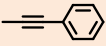
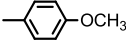
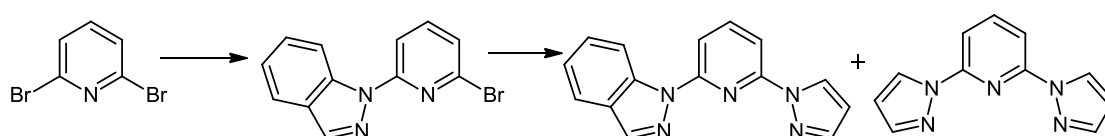
	R	-NH ₂ (7)	Hidrólisis(8)	-NCS (9)
a		88%	90%	59%
b		70%	80%	83%
c		61%	84%	78%
d		93%	63%	-

Tabla 3.3

3.1.2. Síntesis de los Ligandos derivados del 1-ipp.

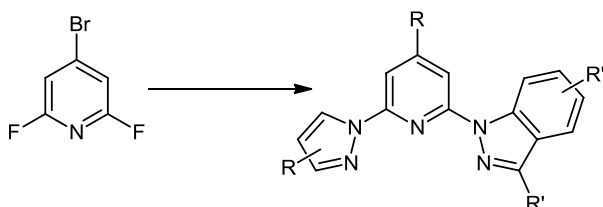
Otra de las alternativas para la síntesis de ligandos antena eficaces planteadas en los objetivos de este proyecto fue la utilización de ligandos poliheterocíclicos con el esqueleto de indazolipirazolilpiridina.

La síntesis de este tipo de ligandos no simétricos de piridina fue planteada teniendo como referencia un único trabajo publicado por Pritchard y Halcrow en el momento de empezar esta tesis. Tal y como se comentó en la introducción, este trabajo proponía la síntesis de indazolipirazolilpiridinas, sin sustituyentes, partiendo de la 2,6-dibromopiridina, como se muestra en el Esquema 3.13.



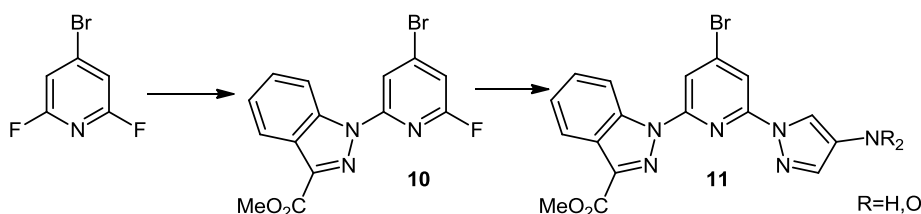
Esquema 3.13

Nuestro proyecto, más ambicioso, plantea la síntesis de estructuras mixtas, con anillos de pirazol e indazol en posiciones 2 y 6 de la piridina, añadiendo una tercera funcionalización en posición 4 de la piridina en la línea de los presentados en los ligandos bipirazólicos anteriores Esquema 3.14



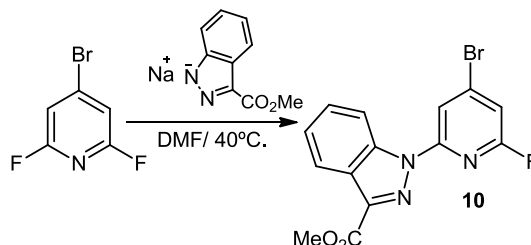
Esquema 3.14

De esta manera, a la vista de los resultados obtenidos por Pritchard y Halcrow, y con nuestra experiencia en la síntesis de bispirazoles, la estrategia inicial planteada para el acceso a estos derivados es la representada en el Esquema 3.15.



Esquema 3.15

En ella, se introduce el anillo de indazol, en presencia de NaH y utilizando DMF como disolvente tal y como se muestra en el Esquema 3.16. En nuestro caso, se utiliza el 3-metoxicarbonilindazol, y se obtiene el 4-bromo-6-fluor-2-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)piridina con buenos rendimientos (84%).

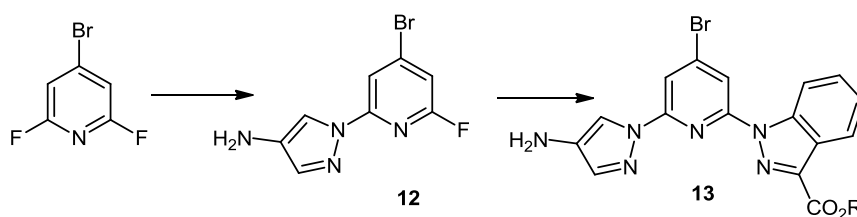


Esquema 3.16

En una segunda etapa se introduce anillo de pirazol mediante una segunda reacción de sustitución del átomo de flúor restante por el anillo de pirazol. En una primera aproximación se utiliza el 4-aminopirazol bajo diferentes condiciones de reacción (disolvente, temperatura y base), sin obtenerse el producto deseado. Ante estos resultados se abordó la introducción del anillo de pirazol igual que en el caso de los derivados de bispirazolpiridina. Se hizo reaccionar el derivado fluorado con el 4-nitropirazol como precursor del grupo amino. En este caso se obtuvieron mezclas de reacción complejas de las que solo pudo ser aislado el producto en cantidades no significativas (<10%). En ninguno de los dos casos se observó el intercambio del anillo de indazol por el anillo de pirazol, como reportó Halcrow.

Al no lograrse las condiciones óptimas para la obtención de los derivados de 2-indazolil-6-pirazolilpiridina (ipp) a partir de la 2-fluoro-6-indazolilpiridina, se decidió cambiar de estrategia. Uno de los esquemas planteaba la posibilidad de introducir en un primer paso el 4-aminopirazol para posteriormente introducir el grupo 3-metoxicarbonilindazol, según describe el Esquema 3.17. De esta manera se obtuvo el derivado de indazolilpirazolilpridina deseado con moderados rendimientos (30-35%).

La obtención del producto **13** contrasta con los resultados obtenidos por Halcrow y cols. que se mostraron en la introducción, la presencia del anillo de pirazol no parece impedir la entrada del sustituyente 3-metoxicarbonilindazol, mientras que la presencia del 3-metoxicarbonilindazol en el anillo de piridina impide la entrada del anillo de 4-aminopirazol. Estos resultados son opuestos a los descritos en la bibliografía, aunque tal y como se ha comentado hay ciertas diferencias entre lo aquí descrito y los antecedentes (los anillos de indazol y pirazol presentan los sustituyentes éster y amino respectivamente, y la sustitución nucleófila se lleva a cabo con átomos de flúor en vez de átomos de bromo).

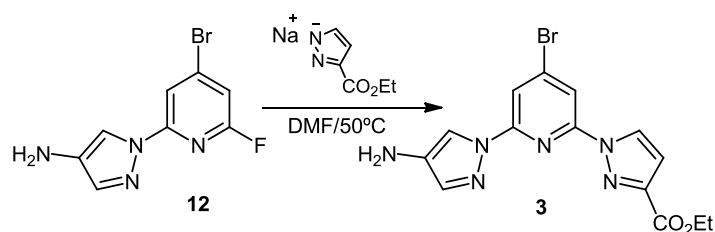


Esquema 3.17

La obtención de estos prometedores resultados hizo posible la optimización de la reacción. Para la síntesis del 4-bromo-2-(4-amino-1-pirazolil)-6-fluoropiridina (**12**), se utilizaron las mismas condiciones ya utilizadas para la síntesis de 4-bromo-2-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-6-fluoropiridina, THF como disolvente y NaH como base a temperatura ambiente. En este caso el derivado monosustituido (**12**) se obtiene puro con un rendimiento del 60%. Al tratarse de un pirazol sustituido en posición 4, el anión presenta un eje de simetría C_2 y no da lugar a mezclas de regioisómeros.

Para la sustitución del segundo átomo de flúor por el 3-metoxicarbonilindazol, se necesitan condiciones más enérgicas, teniéndose que utilizar DMF, aumentando la temperatura (40-50°C) y prolongando el tiempo de reacción durante 12h. Al añadir agua sobre la mezcla el producto precipita sin necesidad de purificación ulterior obteniéndose la 4-bromo-2-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)-6-(4-amino-1-pirazolil) piridina **13** con un 84% de rendimiento.

A la vista de los excelentes resultados obtenidos, se decidió retomar el acceso al compuesto bipirazólico 4-bromo-2-(3-etoxicarbonilpirazolil)-6-aminopirazolilpiridina (**3**) descrito antes, empleando la misma estrategia. El resultado es consistente y **3** se obtuvo con un rendimiento del 58%. Los datos espectroscópicos de H-RMN coinciden con los obtenidos mediante la síntesis descrita en el Esquema 3.18.



Esquema 3.18

Esta nueva ruta sintética para la obtención de **3**, aumenta el rendimiento de la reacción de un 41% a un 58% al cambiar el orden de la introducción de los pirazoles sobre el anillo de piridina. Y constituye un prometedor resultado para abordar la síntesis de nuevos ligandos derivados de 1-bpp.

La presencia del grupo amino en el sustituyente no parece impedir la entrada del segundo sustituyente, al contrario ocurre cuando el sustituyente es el 3-etoxycarbonilpirazol o 3-metoxycarbonilindazol (Figura 3.6). Estos datos permiten optimizar la ruta sintética propuesta para la síntesis de los derivados bispirazólicos presentada en el Esquema 3.8, para ser sintetizados a partir de la 2-(4-aminopirazolil)-4-bromo-2-fluoropiridina a través de un paso menos de reacción.

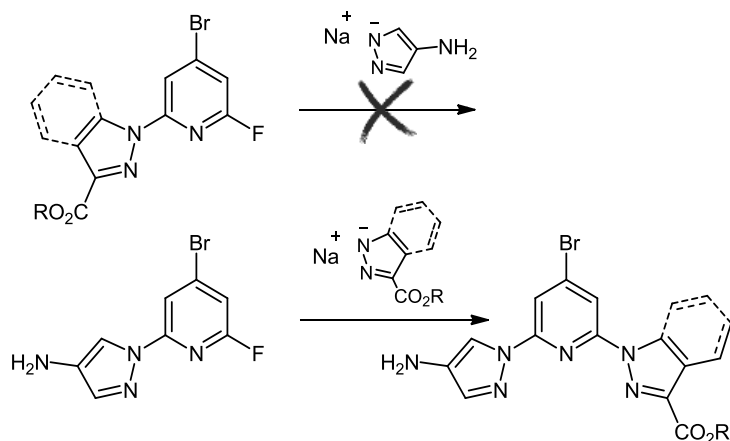
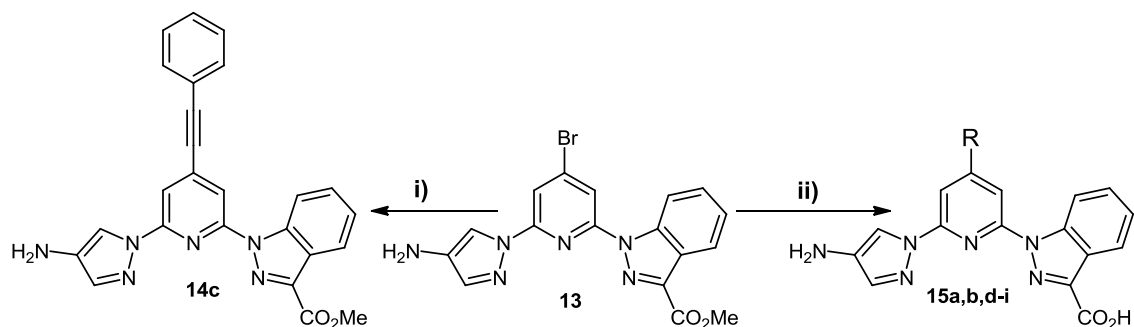


Figura 3.6

La presencia del átomo de bromo en el producto **13** da, de nuevo, acceso a los diferentes acoplamientos vía paladio descritos con anterioridad y que permiten obtener las piridinas trisustituidas deseadas (Esquema 3.19).

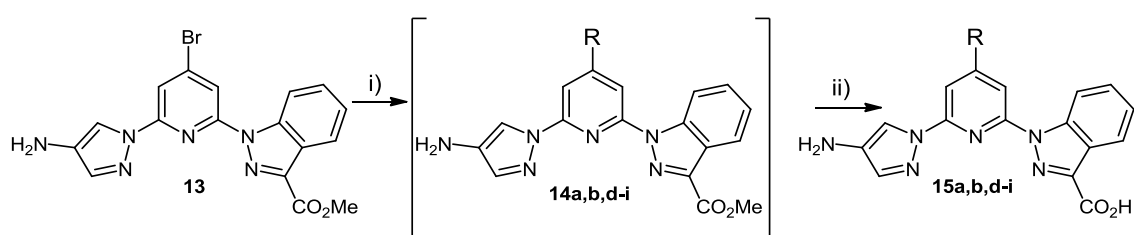


Esquema 3.19 i) Reacción de Sonogashira, Etinilbenceno, $\text{Pd(PPh}_3\text{)Cl}_2$, CuI , THF, NEt_3 , MW 130°C , 15min.; ii) Reacción de Suzuki; Ac. Arilborónico, $\text{Pd(PPh}_3\text{)}_4$, KOH (aq) , DMF, MW 150°C , 15min.

El uso del microondas en la reacción de Suzuki-Miyaura permitió obtener, de nuevo, el producto de acoplamiento, y además se observaron cantidades variables del ácido carboxílico resultante de la hidrólisis del éster en el medio de reacción. La hidrólisis del éster metílico es especialmente favorable como reacción adicional a la de acoplamiento perseguida cuando se emplea como base hidróxido potásico, KOH (1M), que debido a la

temperatura alcanzada mediante microondas favorece esta hidrólisis, que no era observada en condiciones atmosféricas y que permite por tanto realizar dos etapas de la síntesis propuesta en una sola etapa experimental.

La aparición de este producto minoritario permitió la puesta a punto de las condiciones de la reacción de Suzuki para obtener el producto de acoplamiento hidrolizado como producto mayoritario. De esta manera el uso de una mayor concentración y exceso de base (KOH, 2M) y el empleo de DMF como disolvente, que permite aumentar la temperatura de la reacción de 130°C a 150°C, da lugar en un solo paso al producto de reacción de acoplamiento e hidrólisis de forma mayoritaria y con buenos rendimientos (Esquema 3.20).



Esquema 3.20 Reacción de Suzuki usando radiación microondas, i) acoplamiento C-C, ii) hidrólisis

Esta optimización, permite acceder a los ligandos deseados en, tan solo, tres etapas de reacción. Lo cual supone un ahorro de tiempo, disolventes además de traducirse en un mayor rendimiento.

Aunque inicialmente, la reacción fue llevada a cabo con los mismos sustituyentes aromáticos en posición 4 de la piridina que en el caso de los ligandos bispirazolilpiridina (fenilo, tiofeno y 4-metoxifenilo), estudios posteriores nos llevaron a hacer un estudio sobre la influencia de la presencia de diferentes grupos funcionales en el anillo bencénico. Así, se utilizaron grupos aceptores y donadores de electrones, como nitro y metoxilo, en diferentes posiciones del anillo bencénico, para lo cual se utilizaron los siguientes ácidos borónicos (Figura 3.7).

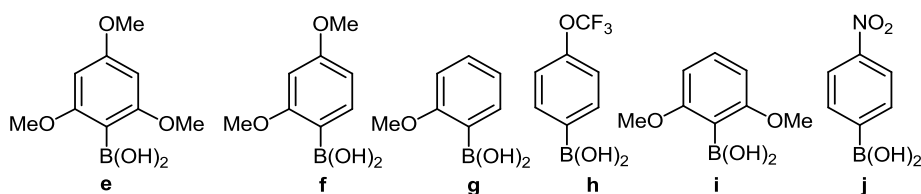


Figura 3.7

En todos los casos, los espectros de ^1H -RMN tras la reacción de Suzuki muestran la aparición de las señales características de los protones aromáticos de los grupos introducidos, y además desaparición de la señales correspondiente al grupo metilo del éster sobre el anillo de indazol.

En el caso de la reacción de acoplamiento de Sonogashira, al emplearse una base débil como la trietilamina, en vez de KOH, el producto que se obtiene es el 2-(3-metoxycarboxil-1*H*-indazolil)-4-fenilieninil-6-(4-amino-1*H*-pirazolil)piridina. Por ello, hace falta una posterior reacción de saponificación para la obtención de la 2-(3-carboxil-1*H*-indazolil)-4-fenilieninil-6-(4-amino-1*H*-pirazolil)piridina.

La adición de tiofosgeno, sobre una mezcla de agua cloroformo que contiene el “amino-carboxilato”, conduce a la formación del grupo isotiocianato. La presencia de los diferentes isotiocianatos ($\text{S}=\text{C}=\text{N}-$) se confirma por la presencia de su banda característica en sus espectros de IR.

La Tabla 3.4 muestra los rendimientos obtenidos en las reacciones de acoplamiento y posterior transformación del grupo amino en isotiocianato



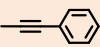
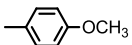
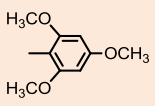
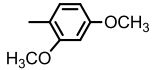

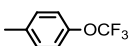
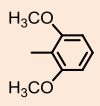
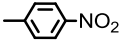
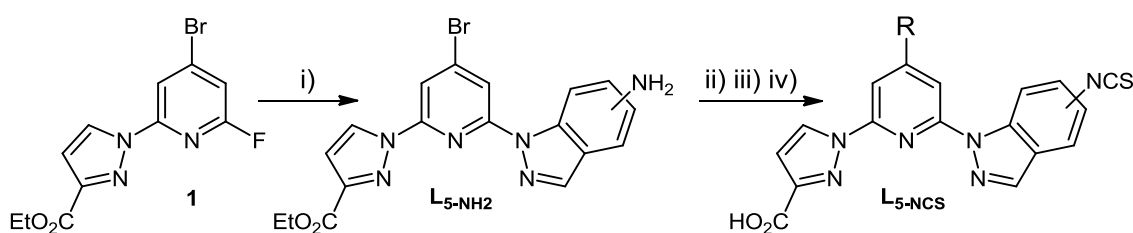
	R	-NH ₂ (15)	-NCS (16)
a		60%	45%
b		62%	82%
c		82%	65%
d		99%	43%
e		67%	63%
f		88%	59%
g		90%	50%
h		85%	62%
i		92%	54%
j		86%	-

Tabla 3.4

De manera paralela a la síntesis de estos compuestos y en el contexto del proyecto europeo ACUSEP, en el laboratorio se abordó la preparación de isómeros estructurales

a los ligandos indazolil pirazolil piridina (1-ipp) descritos, en los cuales la función NH₂/NCS se halla sobre el anillo de indazol en lugar de sobre el pirazol, mientras que el ácido carboxílico está ahora en la posición 3 del anillo de pirazol en lugar de sobre el indazol. La síntesis de estos ligandos se ha abordado por cualquiera de los dos esquemas recogidos en el Esquema 3.21, Para el caso de los derivados de 5-aminoindazol (Esquema 3.21) es el mismo que el que se ha descrito para el acceso a los bipirazoles descrito anteriormente, pero en el que, pero el trabajar con indazoles implica utilizar condiciones de reacción más energéticas. En el caso de los derivados de 6-aminoindazol, la preparación se abordó para los compuestos bisindazólicos y de modo similar a lo observado en nuestro caso, el primer anillo introducido es el heterociclo aminado, en este caso el 6-aminoindazol (Esquema 3.21).¹¹¹



Esquema 3.21 i) aminoindazol, NaH,DMF, 50°C. ii) reacción de acoplamiento C-C. iii) Hidrólisis. iv) Tiofosgeno CHCl₃/NaCO₃

El inconveniente de la síntesis de estos productos con 5-amino indazol o 6-aminoindazol, es la presencia de mezclas de regioisómeros en la reacción de sustitución nucleófila, a diferencia de lo observado con la introducción del 3-metoxycarbonilindazol o del 3-etoxycarbonilpirazol. En el caso del 5-aminoindazol se obtiene la mezcla de isómeros correspondientes a la regioquímica 1,5 y 2,5 (Figura 3.8).

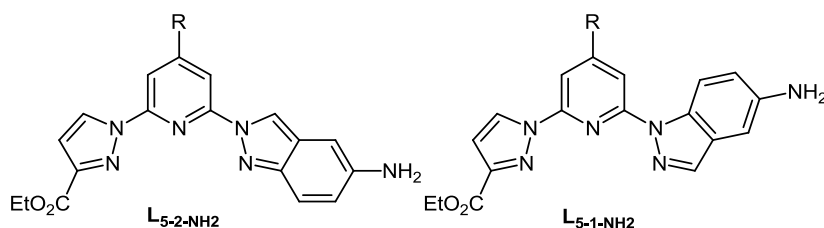


Figura 3.8

Para estos aminoindazoles, la ausencia de sustituyente en posición 3 sobre el anillo de 5 miembros no favorece de modo claro la formación de ninguno de los dos tautómeros

¹¹¹ Laura Galan. *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Madrid, Junio 2015.

indazolato posibles. De este modo ni factores estéricos ni electrostáticos influyen en la preferencia, en la que tampoco el grupo amino, ya esté situado sobre la posición 5 ó 6 del anillo bencénico marca diferencias sobre ninguno de los dos indazolatos tautómeros (Figura 3.9).

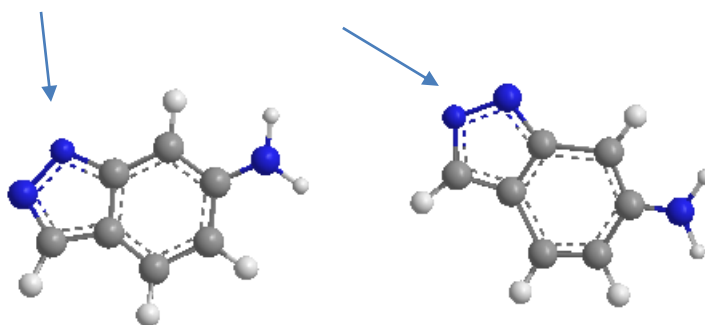


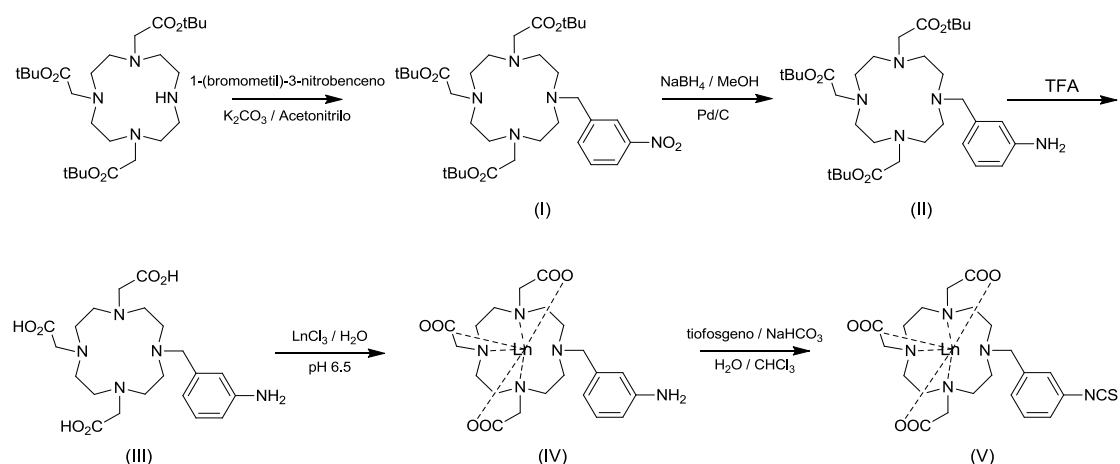
Figura 3.9 Tautómeros posibles del anión de 6-aminoindazolato

La imposibilidad de aislar un único isómero puro de estos ligandos en el caso de los derivados de 5-aminoindazol, no fue obstáculo para utilizar la mezcla en las posteriores reacciones de conjugación e hibridación que se discuten en el apartado 3.3.

A partir de los ligandos antena con grupos isotiocianato, cuya síntesis se ha descrito hasta aquí, se puede llevar a cabo la conjugación sobre oligonucleótidos para comprobar la idoneidad de los mismos en el sistema final para la detección de secuencias genéticas de bacterias causantes de sepsis. Sin embargo, antes de abordar estos estudios se plantean dos retos a abordar, de un lado disponer del oligonucleótido complementario que lleve el ion lantánido a la proximidad de la antena por reconocimiento simultaneo de las dos sondas marcadas, antena y portador de lantánido y el oligonucleótido bacteriano y por otro, la necesidad de poder evaluar de modo preliminar las capacidades sensibilizadores de los ligandos antena preparados y que se acaban de discutir.

Para el primero de los dos retos es necesario abordar la síntesis de ligandos complejantes de iones lantánidos que presenten buenas propiedades de complejación de lantánidos pero que no posean grupos sensibilizadores de su luminiscencia y al mismo tiempo no saturen la esfera de coordinación del ion, con el fin de permitir la aproximación del ligando antena en el híbrido de los tres oligonucleótidos necesarios para el desencadenamiento del proceso fotofísico que genera la señal luminosa y por consiguiente la confirmación de la presencia de oligonucleótido bacteriano.

De entre la diversidad posible de estructuras complejantes de lantánidos, la necesidad de cumplir con el requisito de que el complejo no sea luminiscente limita las posibilidades de jugar con el número de posiciones coordinantes para conseguir complejos insaturados. En el proyecto ACUSEP se llevó a cabo la elección como ligandos más adecuados, los derivados de poliazacoronas, por permitir controlar fácilmente el número de grupos complejantes mediante restos aminoacéticos sobre los átomos de nitrógenos de las coronas. Entre las posible estructuras y atendiendo a que el triester terbutílico de la 12-tetrazacoorona-4 es comercial se lleva a cabo la síntesis del ligando portador de iones lantánidos [2,2',2''-(10-(3-isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triyl) ácido triacético], representada en el Esquema 3.22 para los iones que se han ensayado hasta la fecha, Eu(III) y Tb(III).¹¹²



Esquema 3.22 Síntesis del quelato transportador de iones lantánidos (ICC-Ln³⁺)

El reto que queda por abordar antes de llevar a cabo reacciones de conjugación e hibridación es conocer el comportamiento que tienen como sensibilizadores de iones lantánidos los ligandos antena cuya síntesis se ha descrito en este capítulo.

¹¹² Karhunen, U., Rosenberg, J., Lamminmäki, U., Soukka, T. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 9011.

3.2. Estudio fotofísico de los ligandos antena

A lo largo de este capítulo se estudian las propiedades fotofísicas de los ligandos cuya síntesis se ha presentado en el capítulo anterior. Estos estudios pretenden evaluar la naturaleza del cromóforo introducido en su función sensibilizadora, además de la naturaleza de los heterociclos presentes en las diferentes estructuras al formar complejos con iones lantánidos portados por éteres corona.

Las características de los ligandos preparados no son las óptimas para la complejación de iones lantánidos en complejos 1:1. El objetivo es disponer de un ligando antena adecuado para la sensibilización del lantánido, pero sin capacidad de aislarlo del medio, ya que el ion es portado por un ligando (ligando portados de iones, ICC) que tiene que tener una estabilidad cinética y termodinámica razonables al formar el complejo y dejar posiciones libres en la esfera de coordinación del metal para permitir la aproximación del ligando antena. Además este ICC no ha de ser fluorescente, para no interferir con el ligando antena.

El concepto de ligando portador de iones fue introducido por Sammers,¹¹³ cuando describió las primeras aproximaciones de complejos aprovechando la sinergia entre dos tipos de ligandos. Uno de ellos actuaba como ligando *apantallante* y portador del ion lantánido, mientras que el otro era el ligando *sensibilizador*, formando, en disolución acuosa, un complejo ternario 1:1 que aislaba al ion lantánido de las moléculas de agua que hay en la disolución y que son responsables de los procesos de extinción de la luminiscencia.^{114,115}

Este sistema requiere que la unión ion Lantánido-ligando apantallante sea irreversible, pero no ha de saturar totalmente la esfera coordinante del lantánido, permitiendo, de este modo, que el ligando sensibilizador pueda acomodar sus grupos quelantes alrededor del lantánido, para formar el complejo ternario, como se muestra en la Figura 3.10.

¹¹³J. Coates, P.G. Samers, R.M. West. *J.Chem.Soc, Perkin trans. 2*, **1996**.

¹¹⁴ Bunzli. *Chem.Soc. Rev*, **2005**, 34, 1048.

¹¹⁵ G.F. de Sá, O.L. Malta, C.D. Donegá, A.M. Simas, R.L. Longo, P.A. Santa-Cruz, E.F. da Silva, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 196, 165.

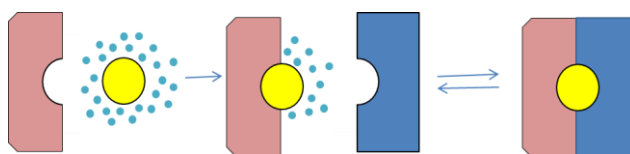


Figura 3.10

Desde la aparición del método propuesto por Sammers, han sido numerosas las aproximaciones, utilizando como quelatos apantallantes compuestos sensibilizados como β -dicetonas. A modo de ejemplo Stanley y cols. utilizaron el derivado de la bispirazolilpiridina que aparece en la Figura 3.11, como sensibilizador de un complejo de Eu en los que utilizaba dicetonas como quelatos apantallantes, en este caso ambos ligandos son buenos sensibilizadores de la emisión del lantánido.¹¹⁶

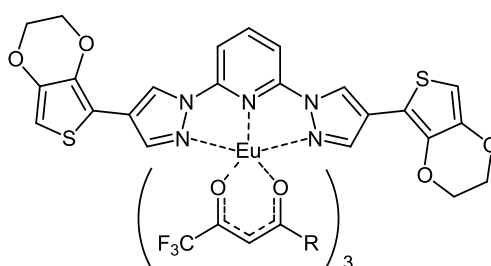
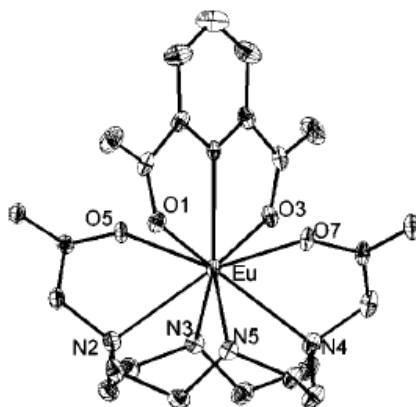


Figura 3.11

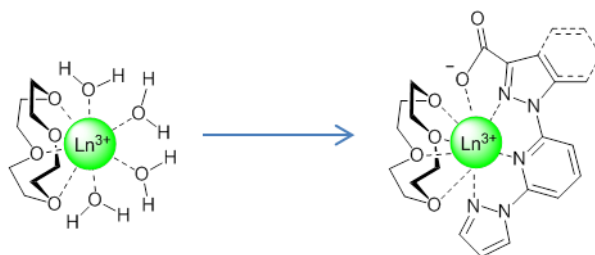
No fue hasta 2006, cuando Kirby y colaboradores introdujeron ligandos macrocíclicos tipo DO₂A para la formación de complejos ternarios con Eu (Figura 3.12).


 Figura 3.12. Estructura del complejo ternario con DO₂A-Eu y el ác. Picolínico

Como se ha comentado, una variación de este tipo de ligandos macrocíclicos serán los empleados como portadores de iones en los bioensayos.

¹¹⁶ J.M. Stanley, X. Zhu, X. Yang, B.J. Holliday. *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 2035.

El método propuesto para el estudio fotofísico desarrollado en este capítulo tiene su base, en el diseño de compuestos ternarios que contienen ligandos macrocíclicos como agentes apantallantes.¹¹⁷ El efecto macrocíclico de los ligandos aumenta la solubilidad y la estabilidad de este tipo de complejos. En este sentido, los ligandos tipo éteres corona oxigenados, como la 14-corona-4, 15-corona-5, han sido ampliamente estudiados por su capacidad de encapsular cationes.¹¹⁸ La afinidad de los iones lantánidos por los átomos de oxígeno hace de los éteres corona ser ligandos indicados para formar este tipo de complejos. Los cuales ayudaran a crear una esfera de coordinación más protegida en relación a las moléculas de agua, proporcionando sus buenos comportamientos espectroscópicos.^{115,119}



Esquema 3.23

Según método descrito por Belian y colaboradores¹²⁰ se lleva a cabo la síntesis de los complejos binarios de Eu y Tb con los éteres corona 12-c-4 y 15-c-5, a partir de los respectivos cloruros de los iones lantánidos ($\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y los éteres coronas libres en una disolución etanol/acetona (1:1). Posteriormente se formaran los complejos ternarios con nuestros ligandos.

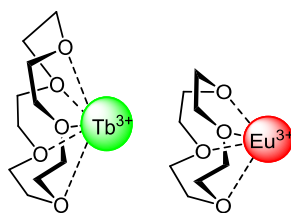


Figura 3.13

¹¹⁷ J.P. Kirby, M.L. Cable, D. Levine, H. B. Gray, A. Ponce. *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 15, 1, 5750; M.L. Cable, P. Kirby, D. Levine, M. Manary, H. Gray, A. Ponce, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 27, 9562.

¹¹⁸ A.J. Stemmler, A. Barwinski, M.J. Baldwin, V. Young, V.L. Pecoraro. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 27, 11962.

¹¹⁹ F.R.G. Silva, J.F.S. Menezes, G.B. Rocha, S. Alves Jr., H.F. Brito, R.L. Longo, O.L. Malta, *J. Alloys Compd.*, **2000**, 303, 364.

¹²⁰ M.F. Belian, G.F. de Sá, S. Alves Jr., A. Galembeck, *J. Luminescence*, **2011**, 131, 856.

La síntesis de los complejos ternarios se realiza disolviendo en etanol el ligando y los complejos portadores de los lantánidos con una estequiometría 1:1. Tras 24 horas de agitación a temperatura ambiente, se elimina el disolvente y el precipitado se lava con etanol frío. De esta manera se pretende eliminar el exceso de reactivos que no hayan formado el complejo ternario. Con el sólido resultante (el complejo) se prepararan las diferentes disoluciones para las medidas de luminiscencia.

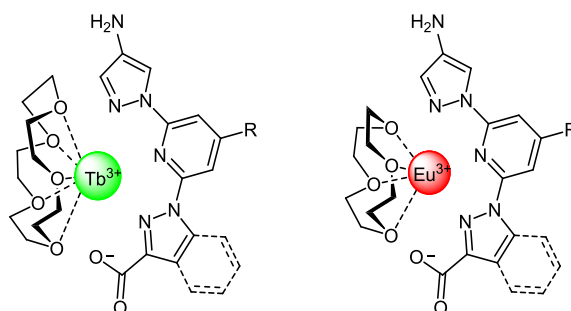


Figura 3.14

3.2.1 Ligandos derivados de bispirazolipiridina

Los ligandos derivados de las bispirazolipiridina han mostrado ser buenos sensibilizadores de la luminiscencia como se ha mostrado en la introducción. A partir de esas consideraciones se ha abordado la síntesis y estudio de luminiscencia de los ligandos que se muestran en la Figura 3.15

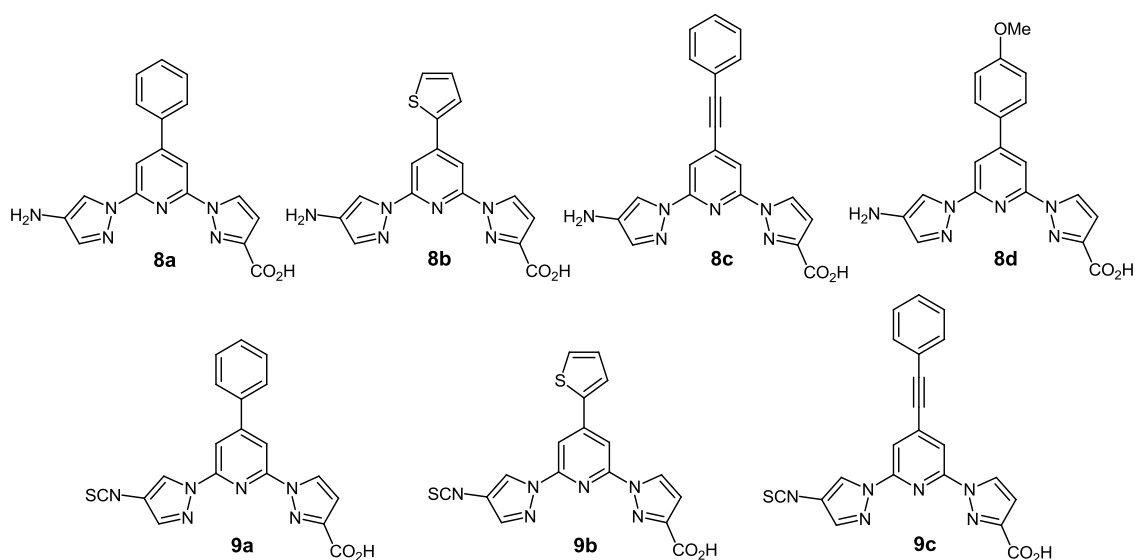


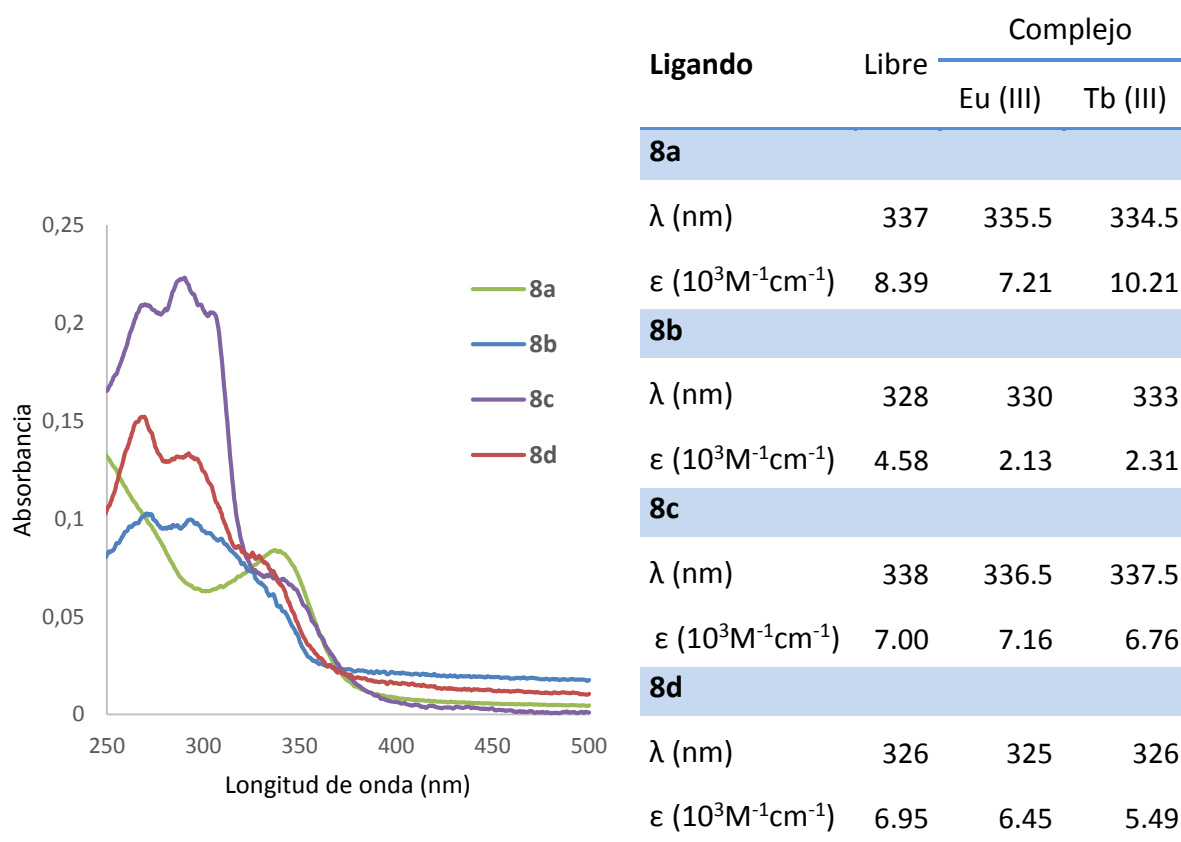
Figura 3.15

Como el objetivo final de este capítulo es la aplicación de los ligandos como sondas luminiscentes *anclados* a oligonucleótidos, a través de un enlace tiourea, el estudio se

realiza sobre los ligandos antes de la conjugación que presentan un grupo isotiocianato y sus precursores con grupo aminoácido.

Los ligandos y sus complejos se han estudiado mediante espectrofotometría de absorción, y excitación/emisión en modo fosforescencia a partir de disoluciones etanólicas de los ligandos en concentraciones de 10^{-5}M . En la Gráfica 3.2 se muestran los espectros de absorción de algunos de los ligandos libres.

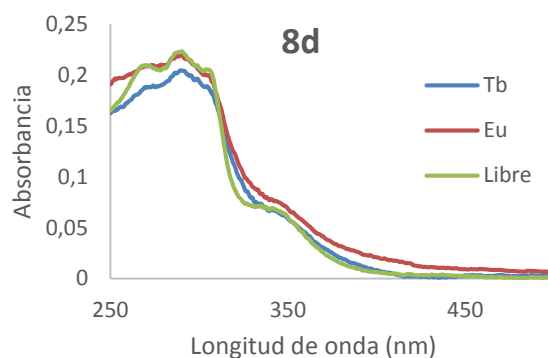
En la Tabla 3.5 se recogen los datos de los espectros de absorción de los ligandos libres y sus complejos con los complejos ternarios de Eu y Tb.



Gráfica 3.2 Espectros de absorción de los ligandos **8a-d**

Tabla 3.5 Absorbancia ligando **8a-d** y sus complejos de Eu y Tb

Los espectros de absorción ultravioleta/visible de los ligandos libres y los complejos de Europio y Terbio son muy similares entre sí (Gráfica 3.3). Esto podría indicar por un lado, que el ligando no varía significativamente su conformación a la hora de complejarse, lo que no implica que no se dé una reorganización; y por otro lado, que el tipo de coordinación con ambos lantánidos es semejante.

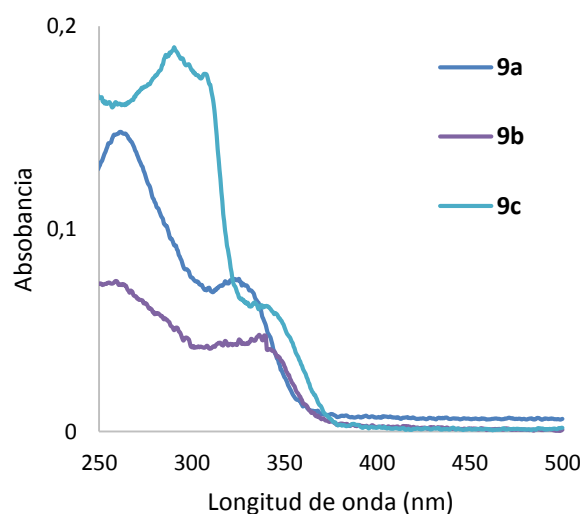


Gráfica 3.3 Superposición de los espectros de absorción del ligando 8d y sus complejos de Eu y Tb

Las medidas de absorción en los ligandos con el grupo isotiocianato tanto libres y complejados, se muestran en la Tabla 3.6. En ellos se puede observar un comportamiento análogo al que presentan los precursores aminoderivados.

Ligando	Libre	Complejo	
		Eu (III)	Tb (III)
9a			
λ (nm)	337	335.5	334.5
ε (10 ³ M ⁻¹ cm ⁻¹)	8.39	7.21	10.21
9b			
λ (nm)	336	335	338
ε (10 ³ M ⁻¹ cm ⁻¹)	5.70	4.71	6.79
9c			
λ (nm)	346.5	336.5	340.5
ε (10 ³ M ⁻¹ cm ⁻¹)	5.5	2.78	5.64

Tabla 3.6 Absorbancia ligando 9a-c y sus complejos de Eu y Tb



Gráfica 3.4 Espectros de absorbancia de los ligandos 9a-c

A la vista de los resultados obtenidos para los complejos se ha llevado a cabo un estudio de tiempos de vida de los complejos formados. El valor del tiempo de vida puede ser indicativo del grado de estabilidad y protección de complejo frente a efectos de desactivación.

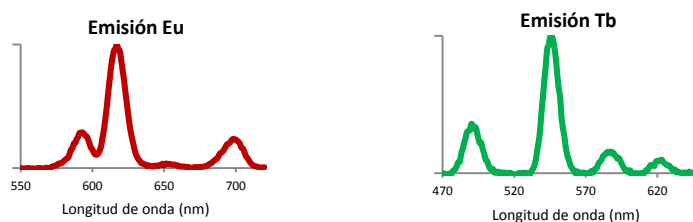
Los tiempos de vida para complejos de Europio y Terbio diseñados para maximizar su sensibilización muestran valores están en el intervalo de 0.5-1.5 ms para el Europio y de 1-2.5 ms para el Terbio. En el caso de los complejos ternarios de nuestros ligandos formados con éteres corona los valores obtenidos son en todos los casos menores.

Como se puede observar en la Tabla 3.7, los valores de tiempo de vida están en torno a 0.4 ms para Europio presentando una mayor dispersión de valores para Terbio, superando en casi todos los casos los 0.5 ms y llegando hasta los 0.8 ms. Estos valores son los esperados, ya que los ligandos utilizados no están diseñados para aislar al ion en disolución y la desexcitación producida por este menos aislamiento y su interacción con el disolvente, en este caso con los niveles vibracionales de los enlaces O-H del etanol provoca este acortamiento de tiempos de vida. Cabe esperar que en el sistema de hibridación final donde se van a medir las emisiones de los iones, están puedan poseer mayores tiempos de vida como consecuencia de un entorno más protegido, tanto por la naturaleza del ICC empleado, como por el entorno producido por las bases nucleicas alrededor del complejo emisor.

	8a	8b	8c	8d	9a	9b	9c
$\tau_{(\text{Tb III})}$ (ms)	0.49	0.58	0.58	0.71	0.43	0.85	0.41
$\tau_{(\text{Eu III})}$ (ms)	0.39	0.38	0.40	0.43	0.40	0.53	0.39

Tabla 3.7 Tiempos de vida de los complejos de Eu y Tb

Los espectros de emisión para cada complejo se han realizado utilizando la longitud de onda de absorción de menor energía (Tabla 3.8 y Tabla 3.9), obteniéndose así los espectros de emisión característicos para cada ion lantánido (Gráfica 3.5).



Gráfica 3.5 Espectros de emisión característicos de Europio y Terbio

La longitud de onda de emisión principal para cada complejo es característica inequívoca del ion lantánido. Siendo de 616nm para el Europio y 545nm para el Terbio. Aunque los espectros de emisión para todos los complejos presenten la misma longitud de onda, no presentan la misma intensidad en las bandas, ya que está condicionada por la eficacia de la transferencia energética ligando-metal.

	Complejo	
	Eu (III)	Tb (III)
8a		
λ (nm)	318	319
I. (u.a.)	5.4	7.8
8b		
λ (nm)	320	338
I. (u.a.)	1	0.4
8c		
λ (nm)	320	319
I. (u.a.)	4.7	8.4
8d		
λ (nm)	320	321
I. (u.a.)	1	2.8

Estudio de fosforescencia para los complejos de Eu y Tb de los ligandos 8a-d

	Complejo	
	Eu (III)	Tb (III)
9a		
λ (nm)	323	320
I. (u.a.)	8.56	75.9
9b		
λ (nm)	332	338
I. (u.a.)	4.71	6.79
9c		
λ (nm)	315	340.5
I. (u.a.)	5.4	11.1

Estudio de fosforescencia para los complejos de Eu y Tb de los ligandos 9a-c

La intensidad de emisión para los complejos con Terbio, es mayor que para los complejos con Europio, excepto en aquellos que para aquellos ligandos que presentan un anillo de tiofeno como sustituyente (**8b** y **9b**) los cuales favorecen la luminiscencia de Europio, estos resultados coinciden con lo descrito en la bibliografía, donde la sustitución de un grupo fenilo por un grupo tienilo favorece la luminiscencia de Europio en detrimento de la luminiscencia de Terbio.

Las intensidades de emisión del complejo de Terbio del ligando **9a**, que presenta un fenilo como sustituyente y el grupo isotiocianato son las altas y por tanto este ligando parece ser el más prometedor de la serie.

Al comparar los valores de intensidad obtenidos para los ligandos con grupo amino respecto a sus análogos con grupos isotiocianato, se observa que los valores para los aminoderivados son menores que para los que tienen el grupo isotiocianato. Estos resultados pueden ser debidos a un proceso de transferencia electrónica fotoinducida (PET), que ocurriría desde el par de electrones libres del nitrógeno del grupo amino hacia el ion lantánido (Figura 3.6).

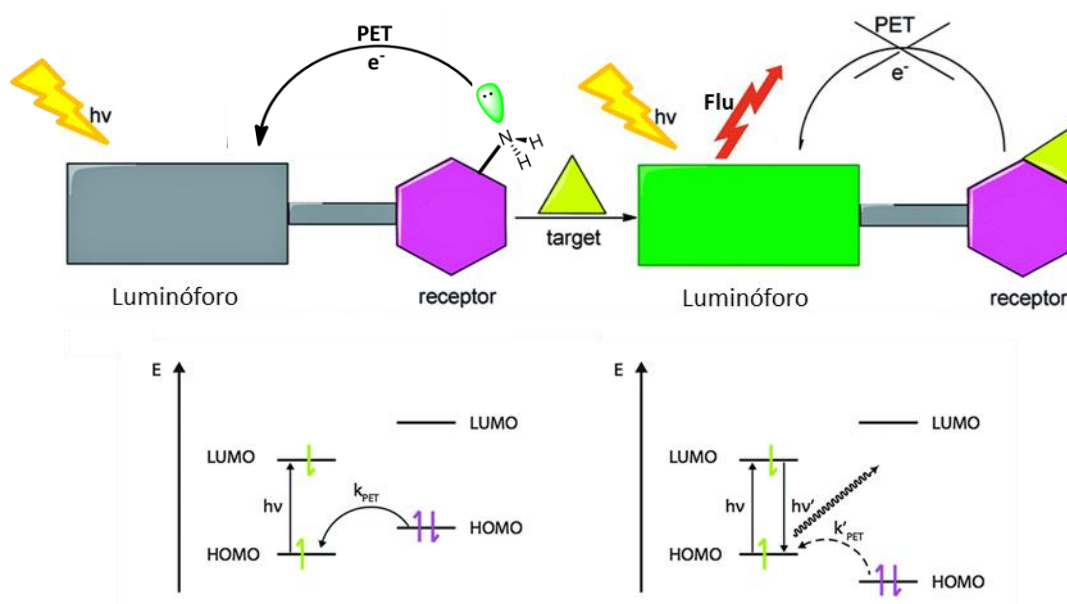


Figura 3.16 Fenómeno de transferencia electrónica fotoinducida (PET)

La consecuencia del PET provocado por la basicidad grupo -NH_2 es la extinción parcial de la sensibilización hacia el ion lantánido, aunque no en todos los casos esta competencia es igual de efectiva.¹²¹

Este efecto parece tener mayor incidencia en el ligando **8a**, ya que su análogo **9a** presenta una intensidad de luminiscencia en torno a diez veces mayor. En el resto de casos el efecto es menor, ya que pese a presentar mayores intensidades los ligandos con grupos isotiocianato, la diferencia es menor.

Los espectros de excitación de los complejos de Europio y Terbio de los ligandos con el grupo amino (**8a**, **8b**, **8c** y **8d**) presentan máximos en torno a 320 nm., este valor de longitud de onda es significativamente menor que el observado en los espectros de absorción de los mismo ligandos. Al formarse el complejo se produce un desplazamiento ipsocrómico el cual es consecuencia de un aumento en la energía de los estados singlete y triplete del ligando al formar el complejo, esta desestabilización al formar el complejo es la responsable también de los bajos valores de tiempos de vida registrados.

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que fenilo es el mejor para la sensibilización de Terbio.

¹²¹ A. Prasanna de Silva, D.B. Fox, T.S. Moody, M.S. Weir, *Pure Appl. Chem.*, **2001**, 73, 503.

3.2.2 Ligandos derivados de indazolipirazolipiridinas (ipp).

La sustitución de un anillo de pirazol por un anillo de indazol en la estructura de los ligandos busca obtener mejoras en la intensidad de emisión al conseguir mayores absorptibilidades y desplazar los máximos de emisión a regiones más próximas al visible, lo que permite abaratar los costos asociados a la instrumentación para su determinación.

Al igual que en el caso de los derivados de 1-bpp, estudiados anteriormente, estos ligandos han de portar un grupo quelante (carboxilato) y un grupo que permita su enlace con el oligonucleótido (isotiocianato), o un precursor de este, como el grupo amino. Aunque inicialmente se prepararon ligandos con los sustituyentes en 4 de la piridina utilizados anteriormente (**a-d**), los buenos resultados obtenidos y que se discutirán más de aquí en adelante, permitieron aumentar la familia de ligandos estudiados utilizando nuevos cromóforos con diferentes demanda electrónica, representados en la Figura 3.17. De esta manera se ha realizado un estudio sobre sobre la influencia ejercida por la introducción de centros cromóforos, con diferente demanda electrónica, en la actividad luminiscente de los ligandos **15(a-j)** y **16(a-i)**

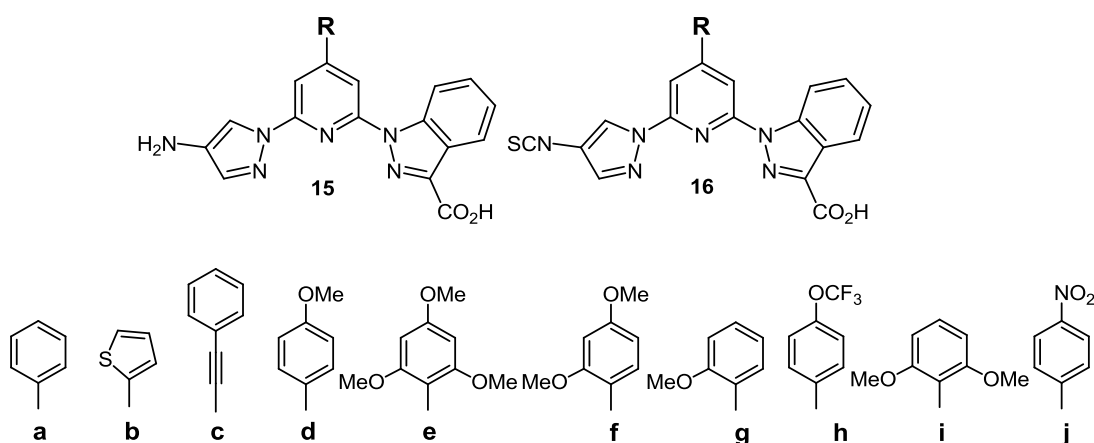
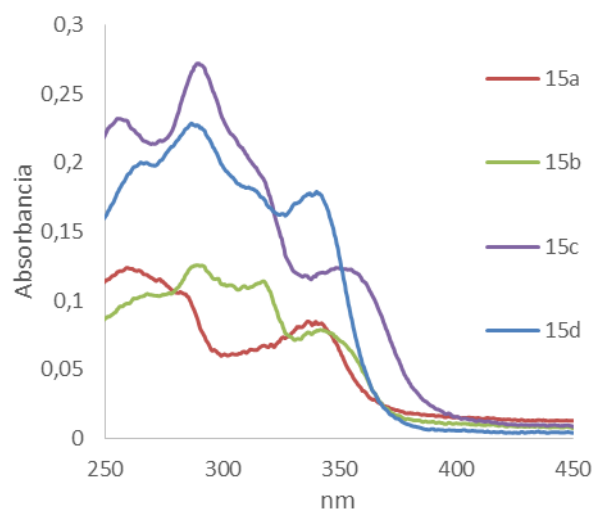


Figura 3.17

Los ligandos, tanto grupo amino como con el grupo isotiocianato, y sus complejos ternarios 1:1 han sido estudiados mediante espectrofotometría de absorción, y excitación/emisión en modo fosforescencia en disoluciones etanólicas de los ligandos en concentraciones de 10^{-5}M . En la Gráfica 3.6 se pueden observar, a modo de ejemplo, los espectros de ultravioleta visible de los ligandos **15(a-d)**.



Gráfica 3.6 Espectros de absorción de los ligandos **15a-d**

La Tabla 3.10 y la Tabla 3.11 recogen los datos obtenidos de los espectros de absorción ultravioleta de los ligandos libres y sus complejos con los complejos ternarios de Europio y Terbio.

Ligando	Libre	Complejos	
		Eu (III)	Tb (III)
15a			
λ (nm)	336.5	338.5	334
ϵ ($10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	7.5	3.2	3.9
15b			
λ (nm)	342	343	344
ϵ ($10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	7.9	5.1	4.7
15c			
λ (nm)	349.5	354	350.5
ϵ ($10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	12.4	3.9	4.9
15d			
λ (nm)	340.5	340.5	340.5
ϵ ($10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	17.9	3.1	5.2

Ligando	Libre	Complejo	
		Eu (III)	Tb (III)
16a			
λ (nm)	337	341	339
ϵ ($10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	10.9	9.3	8.0
16b			
λ (nm)	344	345	346
ϵ ($10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	5.9	4.4	4.3
16c			
λ (nm)	349	336	338
ϵ ($10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	7.5	1.3	3.5
16d			
λ (nm)	331	333	333
ϵ ($10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	22.7	13.0	15.2

15e			
λ (nm)	331	331	330
ϵ ($10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	24.2	18.3	13.7
15f			
λ (nm)	332.5	331	328.5
ϵ ($10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	15.8	9.2	6.5
15g			
λ (nm)	337.5	339	328
ϵ ($10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	12.5	13.7	8.5
15h			
λ (nm)	341	340.5	342
ϵ ($10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	14.6	6.5	8.1
15i			
λ (nm)	333.5	334	334
ϵ ($10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	22.0	15.6	14.6
15j			
λ (nm)	310	312.5	313
ϵ ($10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	17.9	19.3	18.9

Tabla 3.10 Absorbancia ligando **15a-j** y sus complejos de Eu y Tb

16e			
λ (nm)	333	333	335
ϵ ($10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	30.6	27.5	21.4
16f			
λ (nm)	330	332	332
ϵ ($10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	5.5	3.9	6.2
16g			
λ (nm)	344	341	341
ϵ ($10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	10.5	6.3	6.7
16h			
λ (nm)	344	343	343
ϵ ($10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	7.2	8.0	8.5
16i			
λ (nm)	334	321	330
ϵ ($10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	14.7	20.9	16.8

Tabla 3.11 Absorbancia ligando **16a-i** y sus complejos de Eu y Tb

Los datos obtenidos para los ligandos derivados de 1-ipp muestran pequeños desplazamientos en los máximos de absorción de menor energía al formarse el complejo. En todos los casos se observa que un efecto hipocrómico de estos máximos en los complejos respecto al ligando libre (Figura 3.18), lo que podría deberse a la falta de estabilidad de los complejos y la coexistencia de ligando y complejo en disolución, como se discutirá más adelante.

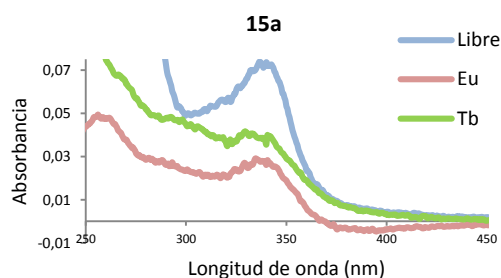


Figura 3.18 Superposición de los espectros de absorción del ligandos **15a** y sus complejos de Eu y Tb.

Con respecto a los ligandos derivados del 1-bpp, la sustitución de un anillo de pirazol por indazol permite desplazar el máximo de absorción a mayores longitudes de onda, lo cual es reflejo de la mayor conjugación de este nuevo anillo en estos ligandos.

Al comparar los valores de desplazamiento del máximo de absorción, y utilizando los ligandos que poseen como sustituyente un fenilo en posición 4 de la piridina, **15a** y **16a**, como referencia, se puede observar que aquellos que poseen sustituyentes en *orto* sobre el fenilo, **16-15e**, **15-16f**, **15-16g** y **15-16i**, muestran un desplazamiento ipsocrómico. Este comportamiento puede ser debido a la presencia de cierto impedimento estérico, como muestra la Figura 3.19, lo cual disminuye la coplanaridad y por ende hay una menor extensión de la conjugación entre los anillos de piridina y fenilo.

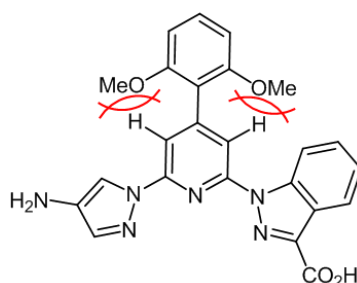


Figura 3.19

En cambio aquellos ligandos que presentan sustituyentes en *para* sobre el fenilo, **15-16b** y **15-16h**, muestran un desplazamiento batocrómico, lo que es indicativo de una mayor extensión en la conjugación, este efecto también se observa en el caso de los feniletinilderivados, **15-16c**. Sin embargo, el ligando **15j** pese a presentar el un grupo nitro en posición para del fenilo presenta un desplazamiento ipsocrómico provocado por su claro carácter de electroaceptor.

Al igual que en los ligandos derivados de 1-bpp, se ha llevado a cabo un estudio de tiempos de vida de los complejos formados, (Tabla 3.12). El valor del tiempo de vida

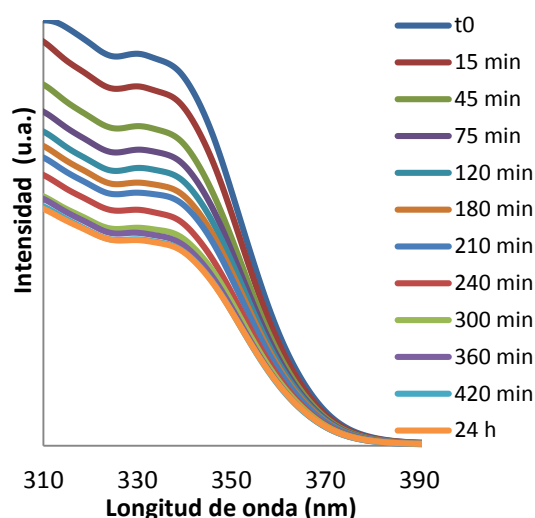
(Ecuación 1.5) puede ser indicativo del grado de estabilidad y protección de complejo frente a efectos de desactivación.

Ligando	15		16	
	τ_{Eu} (ms)	τ_{Tb} (ms)	τ_{Eu} (ms)	τ_{Tb} (ms)
a	0.54	0.84	0.7	0.89
b	0.83	0.56	0.47	0.65
c	0.6	0.61	0.54	1.12
d	0.53	0.74	0.64	2.4
e	0.53	0.64	0.64	1.07
f	0.56	0.79	0.51	0.81
g	0.42	0.52	0.44	0.99
h	0.63	0.91	0.28	0.31
i	0.6	1	0.6	1.01
j	0.56	0.69	--	--

Tabla 3.12 Tiempos de vida de los complejos de Eu y Tb y los ligandos **15a-j** y **16a-i**.

Los tiempos de vida observados siguen el patrón observado en la bibliografía,¹²¹ siendo mayores para los complejos de Terbio que para los de en el Europio, excepto caso del ligando **15b** que como se ha comentado el ligando sensibiliza mejor al ion Europio. Pese a que los valores obtenidos son inferiores a los bibliográficos, esto es debido a la diferencia en el aislamiento de metal respecto al entorno. El valor del complejo **16d** es anormalmente alto con respecto al resto de la serie aunque se encuentra entre valores normales medidos para otro tipo de complejos de lantánidos.

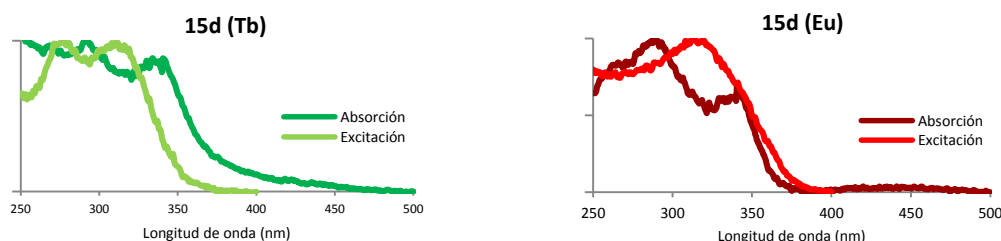
Al registrarse los espectros de emisión se observó la dependencia de la intensidad de fosforescencia respecto al tiempo. Por esta razón se hizo un estudio de la cinética de la luminiscencia de los complejos, registrándose los espectros de excitación a diferentes tiempos.



Gráfica 3.7

Así la Gráfica 3.7 representa el espectro de excitación del complejo ternario del ligando **15d** y el éter corona 15-crown-5 con Terbio. El decaimiento de la señal puede ajustarse a una función logarítmica ($y = -107,4\ln(x) + 1153,4$). Esto demuestra la importancia de registrar los espectros de manera inmediata a su preparación. Esta cinética de disociación de los complejos en disolución es consecuencia de la existencia de un equilibrio entre el ligando libre y el ligando formando parte del complejo ternario, como se comentó anteriormente.

Al comparar los espectros de absorción respecto al de excitación, puede observarse el desplazamiento a menores longitudes de onda de los máximos de excitación respecto a los máximos en los espectros de absorción (Gráfica 3.8).



Gráfica 3.8 Superposición de los espectros de absorción ultravioleta y excitación de los complejos de Eu y Tb del ligando **15d**.

Estos datos corroboran la hipótesis planteada sobre la coexistencia del ligando y el complejo en disolución (Figura 3.20), lo que hace que en los espectros de absorción lo que se observa son ambas contribuciones.

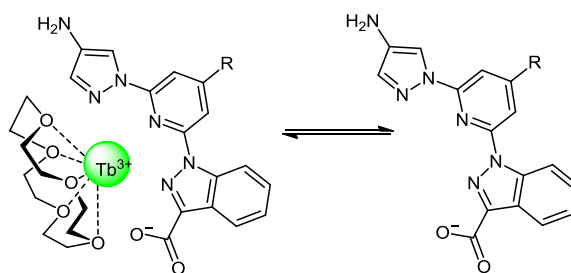


Figura 3.20

En la Tabla 3.13 se recoge el estudio de fosforescencia de los complejos de Europio y Terbio con los ligandos amino **15a-j**.

	Complejos			Complejos	
	Eu (III)	Tb (III)		Eu (III)	Tb (III)
15a			15f		
I.(u.a)	4.27	4.08	I.(u.a)	11.5	49.4
λ (nm)	318	316	λ (nm)	327	312
τ (ms)	0.54	0.84	τ (ms)	0.56	0.79
15b			15g		
I.(u.a)	2.00	0.90	I.(u.a)	11.9	30.8
λ (nm)	320	321	λ (nm)	320	317
τ (ms)	0.83	0.56	τ (ms)	0.42	0.52
15c			15h		
I.(u.a)	3.77	5.13	I.(u.a)	8.3	17
λ (nm)	317	318	λ (nm)	320	314
τ (ms)	0.60	0.61	τ (ms)	0.64	0.91
15d			15i		
I.(u.a)	6.87	16.2	I.(u.a)	6.04	3.06
λ (nm)	317	313	λ (nm)	327	325
τ (ms)	0.53	0.74	τ (ms)	0.6	1
15e			15j		
I.(u.a)	6.89	37.4	I.(u.a)	1.42	4.91
λ (nm)	320	316	λ (nm)	322	325
τ (ms)	0.53	0.64	τ (ms)	0.56	0.69

Tabla 3.13 Estudio de fosforescencia de los complejos de Eu y Tb con los derivados de *ipp-NH₂* **15a-i**

Las intensidades de emisión observadas en la mayoría de los casos son bajas de modo análogo a lo observado para la familia de ligandos bispirazolicos. Este comportamiento nuevamente podría deberse al efecto que el grupo amino produce sobre la emisión luminiscente mediante PET.

Los datos de los estudios de fosforescencia para los ligandos con grupos isotiocianato se recogen en la Tabla 3.14.

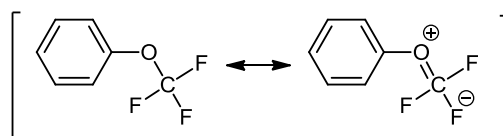
Complejos			Complejos		
	Eu (III)	Tb (III)		Eu (III)	Tb (III)
16a			16f		
I.(u.a)	80.21	251.4	I.(u.a)	133.9	420.3
λ (nm)	332	331	λ (nm)	328	323
τ (ms)	0.7	0.89	τ (ms)	0.51	0.81
16b			16g		
I.(u.a)	0.94	4.24	I.(u.a)	111.4	829.5
λ (nm)	321	321	λ (nm)	339	337
τ (ms)	0.47	0.65	τ (ms)	0.44	0.99
16c			16h		
I.(u.a)	10.6	27.9	I.(u.a)	1.98	8.27
λ (nm)	319	317	λ (nm)	343	337
τ (ms)	0.54	1.12	τ (ms)	0.28	0.31
16d			16i		
I.(u.a)	216.5	725.2	I.(u.a)	20	61.07
λ (nm)	328	326	λ (nm)	335	332
τ (ms)	0.64	2.4	τ (ms)	0.6	1.01
16e					
I.(u.a)	29.83	192.1			
λ (nm)	332	330			
τ (ms)	0.64	1.07			

Tabla 3.14 Estudio de fosforescencia de los complejos de Eu y Tb con los derivados de *ipp*-NCS **16a-i**.

La intensidad de emisión es siempre notablemente mayor para los complejos de terbio que para los de Europio lo que es habitual en una gran mayoría de los casos descritos en la bibliografía y una constante en los ligandos estudiados por nuestro grupo de trabajo y en los que se hayan presentes anillos de piridina y pirazol combinados en la estructura del ligando. Los complejos **16d** y **16g** con grupos donadores de electrones en posiciones

para y orto respectivamente, presentan las mayores intensidades. Los compuestos **16e**, **16f** y **16i**, que presentan grupos donadores en posiciones orto y/o para simultáneamente presentan menores intensidades. Aunque este comportamiento podría deberse a que en el caso de estos ligandos la presencia de grupos metoxilos en posiciones *orto* limitan la coplanaridad de los anillo de piridina y fenilo, el ligando **3e** también tiene un sustituyente metoxilo en *orto* y es el mejor de la serie. Existen otros factores que pueden influir en los valores de emisión de estos complejos, como pueden ser los niveles de energía de los estados triplete que se presentarán más adelante.

Un último punto a destacar son los bajos valores de intensidad que presentan los ligandos **16b**, **16d**, y **16h**. En el caso del ligando **16h** tiene valores muy inferiores al resto de la serie y al que hay que añadir los también bajos valores de sus tiempos de vida podría deberse al diferente carácter electrónico de este grupo. Los átomos de flúor presentan una electronegatividad muy superior a la de los hidrógenos y el grupo trifluorometoxilo tiene un valor de 3.7 frente a los 2.7 del grupo metoxilo en la escala de electronegatividad de Pauling, Este valor hace que el carácter neto de este grupo sea electronatrayente ya que el efecto mesómero electrodonador del grupo alcóxido y también se ve disminuido por una estructura resonante provocada por los átomos de flúor¹²² (Esquema 3.24).



Esquema 3.24 Formas mesómeras de un grupo trifluorometoxilo

Este efecto electrónico variaría los niveles electrónicos del ligando haciéndolos menos idóneos para su transferencia hacia los iones Europio y Terbio.

En base a los datos obtenidos se puede observar en la Figura 3.21 la dependencia de la intensidad de fosforescencia respecto al sustituyente presente en el anillo bencénico.

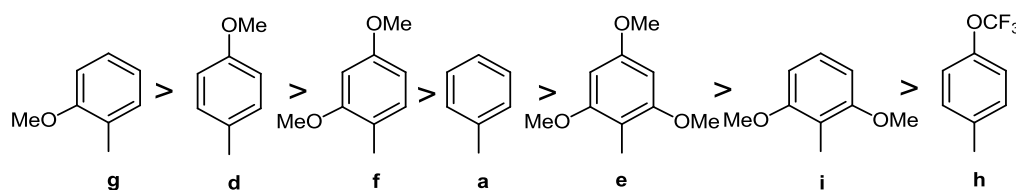


Figura 3.21

¹²² F.R. Leroux, B. Manteau, J.P. Vors, S. Pazenok. *Beilstein J. Org. Chem.* **2008**, 4, 13.

Hasta aquí se han mostrado los resultados de los estudios fotofísicos de los ligandos libres y sus complejos de Europio y Terbio. Al comparar las dos familias de ligandos mostradas, unos con esqueleto bispirazólico y otro los derivados indazolipirazólicos, se observa un aumento de la intensidad de la señal de luminiscencia así como un desplazamiento de los máximos de excitación como de absorción en los ligandos tipo indazolipirazolilpiridina. En ambas familias se observa un efecto PET en los ligandos aminodervados.

El estudio de la influencia ejercida por los fenilos con diferentes sustituyentes nos permite proponer los ligandos *orto*-metoxifenilos como los sustituyentes que muestran mejor comportamiento a la hora de formar complejos de Terbio.

Estado triplete

Para ampliar el estudio de las propiedades fotofísicas relativas a las propiedades de sensibilización de los iones lantánidos por los ligandos preparados, se ha abordado la medida de las energías del estado triplete en su forma de complejo de Gadolinio. Según el mecanismo comúnmente admitido, el estado triplete de los ligandos es responsable de la sensibilización luminiscente de los lantánidos como el Europio y Terbio (Efecto antena).

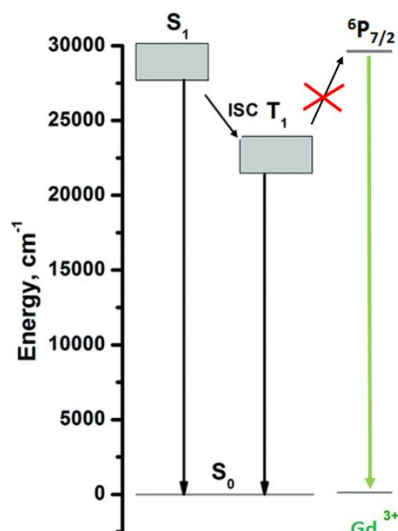
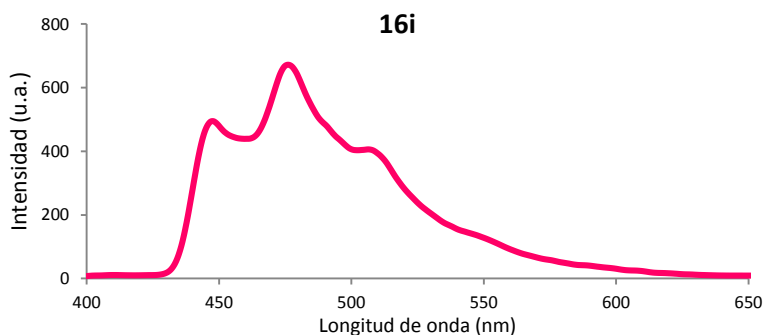


Figura 3.22

La medida de la posición energética del estado triplete se realiza sobre el ion gadolinio, ya que éste no presenta niveles emisivos accesibles desde un ligando coordinado, por lo que no se observa luminiscencia para este ion (Figura 3.22). Los espectros de emisión de fosforescencia a 77K de los complejos de gadolinio corresponden, por tanto, a la fosforescencia del estado emisor triplete del ligando complejoado al ion gadolinio y por extensión al resto de los lantánidos, dada la similitud de su coordinación a un mismo ligando. Este valor puede ser comparado con los datos de los niveles emisivos de Europio y Terbio y las intensidades observadas con el fin de sacar conclusiones acerca de los distintos cromóforos.

Los complejos de Gadolinio estudiados se preparan de forma análoga a la descrita para los complejos de Europio y Terbio, empleando el éter 12-corona-4 como especie portadora del ion Gadolinio. Los espectros se registran en disoluciones etanólicas de los complejos a 77K, y el valor del estado triplete se determina a partir del valor de la energía de transición 0-0 para el espectro de fosforescencia obtenido (Gráfica 3.9)



Gráfica 3.9 Espectro de emisión de fosforescencia del complejo de Gd del ligando **16i**

Este es el procedimiento habitualmente empleado para la medida de estados triplete de complejos Ligando-Gadolinio 1:1 en los que el ligando antena se diseña para una máxima protección del lantánido y en consecuencia buscando la máxima emisión de los complejos sobre complejos con buena estabilidad. En este caso, y según los antecedentes consultados no hay descritas este tipo de aproximaciones con complejos de tipo ternario como los que se han descrito en esta memoria. La baja estabilidad de estos complejos ternarios, mostrada en la cinética de emisión de los mismos, puede ser un problema para este tipo de determinaciones, realizadas a baja temperatura, por lo que los valores obtenidos han de ser estudiados cuidadosamente y los resultados, en caso de producir resultados relevantes, han de ser tomados con cautela.

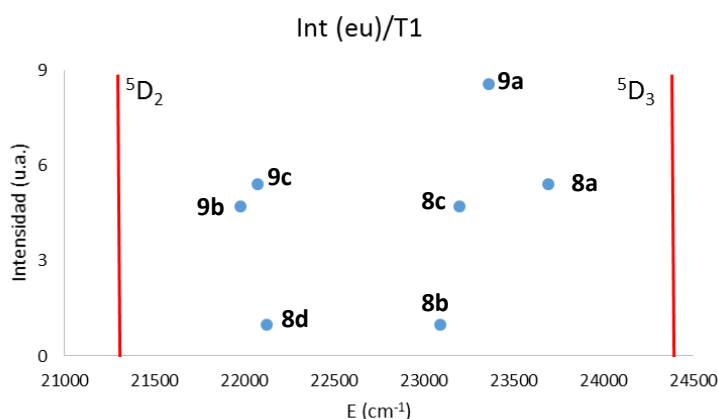
Los datos obtenidos de estas medidas para los compuestos **8-9ad** se representan en la Tabla 3.15:

<i>Ligando</i>	$\lambda(\text{nm})$	E. T ¹ (cm ⁻¹)	<i>Ligando</i>	$\lambda(\text{nm})$	E. T ¹ (cm ⁻¹)
8a	422	23697	9a	428	23364
8b	433	23095	9b	455	21978
8c	431	23202	9c	453	22075
8d	452	22128			

Tabla 3.15

Valores de los niveles Triplete para los ligandos 8-9ad.

En la Gráfica 3.10 y Gráfica 3.11 se representan estos valores en relación con las intensidades de emisión observadas para los complejos de Europio y Terbio y los niveles emisivos más importantes de ambos iones.



Gráfica 3.10 Representación de las energías T_1 de los ligandos 8 y 9a-d frente a la intensidad de emisión de sus complejos de Tb

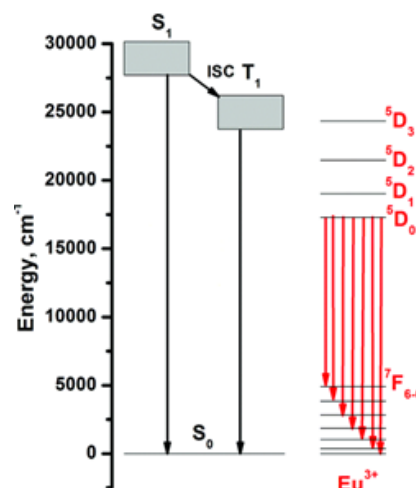
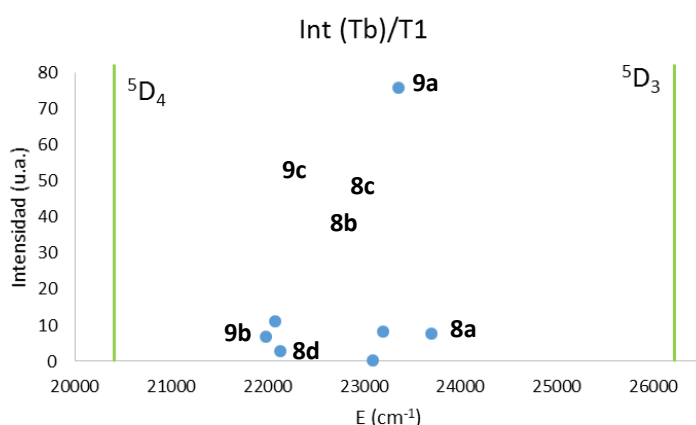


Figura 3.23



Gráfica 3.11 Representación de las energías T_1 de los ligandos 8 y 9a-d frente a la intensidad de emisión de sus complejos de Tb

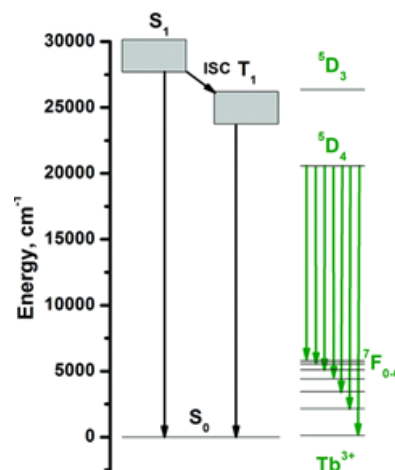


Figura 3.24

La intensidad de las emisiones recogidas en estas gráficas muestra que para el caso de los complejos de Europio con los ligandos bispirazólicos, los niveles triplete se encuentran en el intervalo entre 21900 y 23700 cm^{-1} , que corresponde al intervalo entre los niveles emisivos del Europio 5D_2 y 5D_3 , por lo que todos los ligandos se encuentran en niveles energéticos por encima del 5D_2 y con energías inferiores al nivel 5D_3 .

Para el caso de los complejos de Terbio el valor de intensidad del complejo **9a** se sale de la tendencia seguida por el resto de complejos, siendo de intensidad muy superior al resto. De modo análogo a lo observado para el Europio, todos los valores se encuentran

situados por encima del nivel 5D_4 y por debajo del 5D_3 . En este caso cabe destacar que son pocos los ligandos descritos con niveles triplete superiores a este nivel.¹²³

Los resultados muestran una tendencia en la que los niveles triplete para los ligandos amino es superior que la de los ligandos isotiocianato. Estos valores están mas alejados de los niveles emisivos más bajos, 5D_2 y 5D_4 , de los iones Europio y Terbio respectivamente y podría justificar parcialmente la menor emisión de estos, aunque como ya se ha discutido uno de los factores fundamentales de estas diferencias de emisión sigue siendo debida al efecto PET de los grupos amino.

Los valores obtenidos para los niveles triplete de los ligando “pirazolindazolpiridina” **15a-j** y **16a-i** se recogen en la Tabla 3.16:

<i>Ligando</i>	$\lambda(\text{nm})$	E. T ¹ (cm ⁻¹)
15a	457	21882
15b	450	22222
15c	453	22075
15d	459	21786
15e	459	22472
15f	462	21645
15g	446	22422
15h	448	22321
15i	444	22523
15j	435	22988

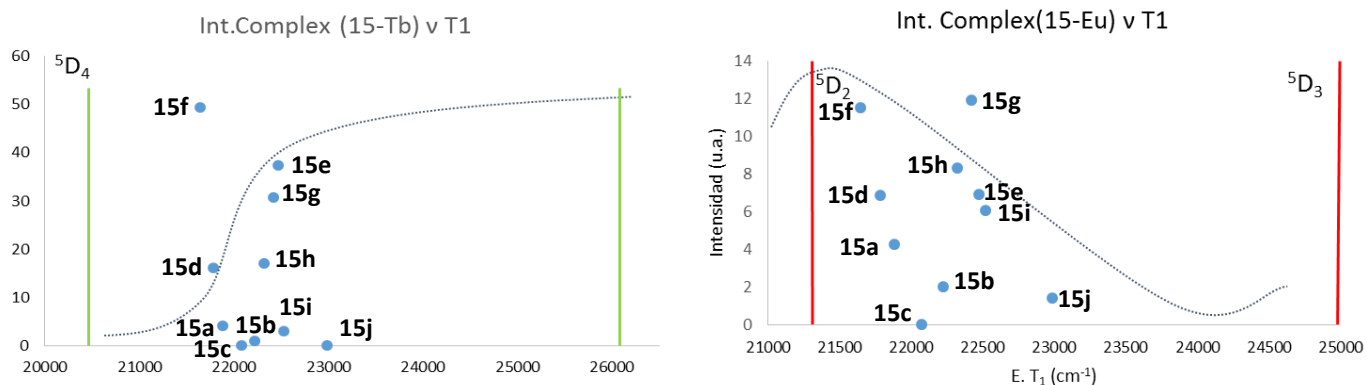
Tabla 3.16 Valores de los niveles Triplete para los ligandos **15 a-j**.

<i>Ligando</i>	$\lambda(\text{nm})$	E. T ¹ (cm ⁻¹)
16a	461	21692
16b	438	22831
16c	420	23809
16d	462	21645
16e	449	22272
16f	463	21598
16g	451	22173
16h	457	21882
16i	447	22371

Tabla 3.17 Valores de los niveles Triplete para los ligandos **16 a-i**.

Los valores obtenidos se analizan por separado para el caso de los ligandos amino **15a-j** e isotiocianato **16a-i**, frente a los niveles emisivos de Europio y Terbio. Las Gráfica 3.12 representan a los ligandos **15a-j**:

¹²³ M. Latva, J.C. Rodriguez-Ubis; *J.Lum.* **1997**, 75, 149.

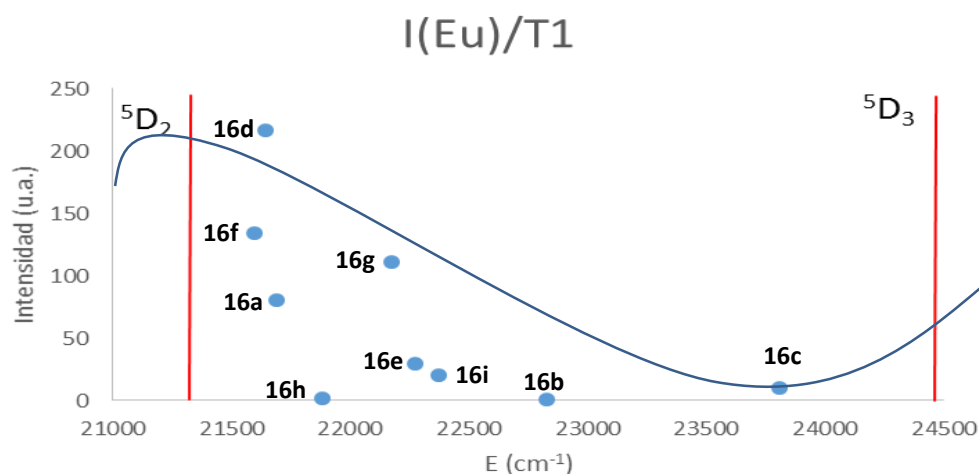


Gráfica 3.12 Representación de las energías T_1 de los ligandos **15a-j** frente a la intensidad de emisión. La línea punteada representa la tendencia observada de complejos luminiscentes de Tb y Eu

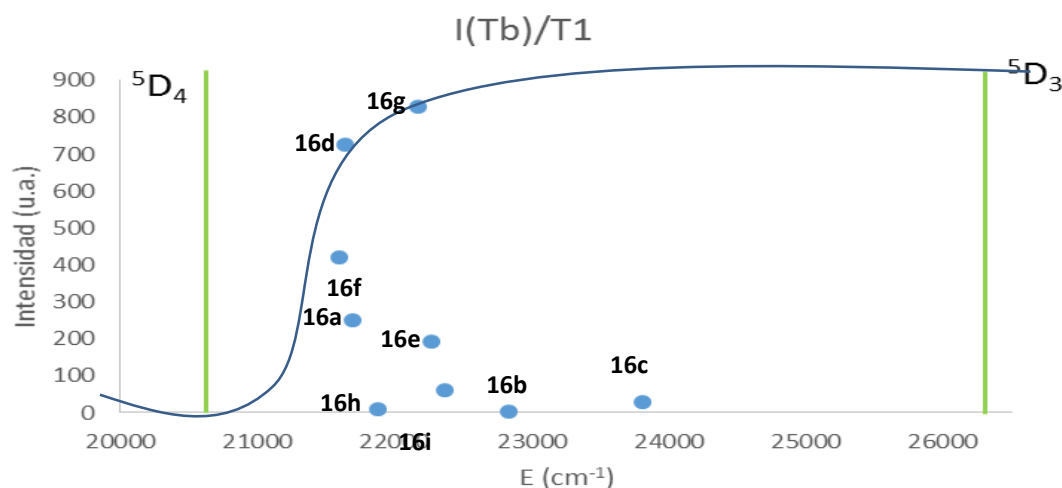
La Gráfica 3.12 muestran de modo análogo a los complejos con los ligandos **8** y **9**, niveles de energía triplete por encima de los niveles emisivos 5D_4 y 5D_2 del Terbio y Europio respectivamente, con valores intensidad muy dispersos en relación a la posición del estado triplete. Todos los estado triplete están situados en niveles adecuados para una correcta transferencia de energía y para el caso del Terbio por encima de los 1850 cm^{-1} respecto del nivel 5D_4 valor que se considera límite para una disminución de la intensidad por retrotransferencia de energía.

Este comportamiento es similar al observado por Latva y cols.¹²³, realizado para una extensa colección de ligandos. En el caso de los complejos con Europio se consiguen buenas correlaciones mientras que para el Terbio hay un mayor grado de correlación. Estos autores proponen curvas de tendencia para estas correlaciones que se superponen a nuestros datos en las Gráfica 3.12 y Gráfica 3.13.

En el caso de los ligandos recogidos en estas gráficas los valores no presentan tendencias como las observadas en la curva. Tanto en el caso del Europio como el del Terbio se observa que para valores de T_1 similares las emisiones difieren mucho. Los diferentes factores que afectan a la emisión del lantánido pueden estar detrás de este comportamiento aunque no se puede descartar, tal y como se ha expuesto anteriormente, que este tipo de complejos ternarios no sean adecuados para la medida de los estados excitados triplete.



Gráfica 3.13 Representación de los valores de energía de T_1 frente a la intensidad medida en los complejos de Eu con los ligandos **16a-i**.



Gráfica 3.14 Representación de los valores de energía de T_1 frente a la intensidad medida en los complejos de Tb con los ligandos **16a-i**.

En general, las intensidades de emisión recogidas en la Gráfica 3.12 y la Gráfica 3.13 muestran para el caso de los complejos de Europio, en ambos ligandos, amino (**15a-j**) e isotiocianato (**16a-i**), siguen una tendencia decreciente en intensidad conforme aumentan los valores de energía del estado triplete. Este hecho confirma la tendencia general observada para el Europio en el que el único nivel que genera emisión es el 5D_0 , por lo que el alejamiento de este nivel de energía favorece otros procesos de desactivación no radiativa.

Estos datos no son concluyentes aunque si orientativos, ya que como se ha discutido la cinética de complejación de los ligandos puede provocar que los valores de intensidad medidos a temperatura ambiente puedan diferir de los observados a temperaturas bajas como consecuencia de su menor estabilidad a estas temperaturas.

A la vista de los resultados del estudio fotofísicos realizado se pueden establecer ciertas bases a la hora de la elección de nuevos ligandos antena, alguno de los cuales presentan interesantes propiedades de emisión. Hasta ahora se ha observado que las estructuras que mayores intensidades de emisión presentan son aquellas que tienen un esqueleto de indazolilpirazolilpiridina.

Además, los ligandos que presentan un fenilo como grupo cromóforo presentan buenos resultados frente al resto de sustituyentes, siendo los ligandos orto-metoxifenilderivados los que presentan las mayores intensidades de emisión en los estudios fotofísicos en disolución utilizando éteres corona como portadores de los iones lantánidos.

La metodología propuesta hasta ahora solo es válida para evaluar de modo preliminar las propiedades de emisión de las diferentes familias en función de sus estructuras y cromóforos. Estos resultados nos permiten poder predecir con mayor precisión el posible comportamiento de los ligandos en el sistema final. Por este motivo, la evaluación definitiva de la eficacia de estos ligandos como marcadores luminiscentes se ha de realizar mediante las reacciones de conjugación e hibridación sobre los oligonucleótidos correspondientes las cuales se describen a continuación.

3.3 Conjugación, Hibridación y Aplicación

Las secuencias de ADN y ARN pueden ser reconocidas mediante una secuencia de bases complementarias a través de un proceso denominado hibridación, por el que cada base se empareja con su complementaria, siguiendo las reglas de apareamiento de Watson y Crick. La especificidad de la hibridación es tal que el desajuste en un solo nucleótido puede desestabilizar la hibridación lo suficiente como para evitarla.

Las sondas binarias, también llamadas sondas duales, se componen de dos secuencias de oligonucleótidos, las cuales al enfrentarse a una cadena complementaria de ácido nucleico se hibridan para formar una doble hélice. Estas sondas pueden ser modificadas químicamente al conjugarse a ligandos orgánicos, como es nuestro caso.

La aproximación de estas sondas al hibridarse en el ácido nucleico correspondiente puede dar lugar a la formación de un complejo que por excitación del ligando orgánico puede dar lugar a una señal medible, tal y como aparece en la Figura 3.25.

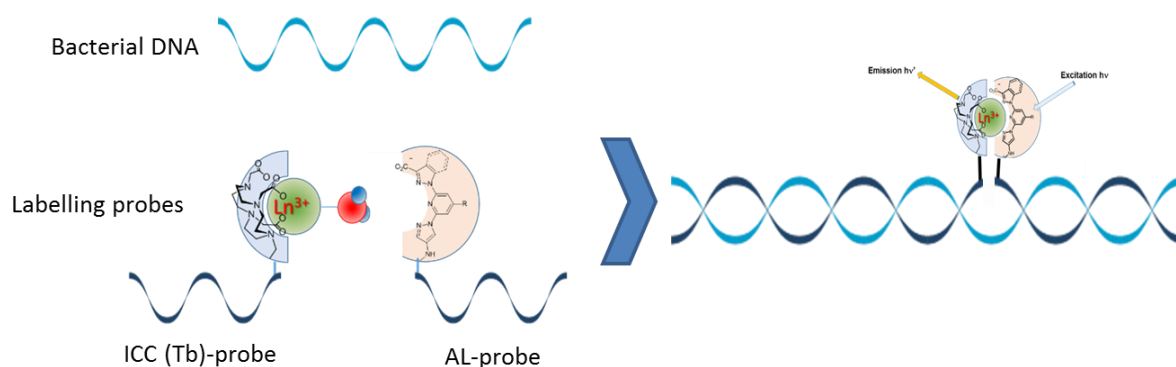


Figura 3.25

La especificidad de la señal producida al utilizar este tipo de sondas binarias, teniendo que producirse la hibridación de ambas simultáneamente sobre el mismo ácido nucleico, resulta muy interesante para el reconocimiento y detección de oligonucleótidos.

La especificidad de la señal luminiscente ha provocado su implementación en los métodos para la detección de ADN como la PCR (polymerase chain reaction). En este caso las sondas se hibridan y deshibridan siguiendo los ciclos de temperatura de la reacción. A mayor cantidad de producto generado, más pares de sondas pueden interactuar aumentando la intensidad de la señal.

Puesta a punto del método

La metodología e instrumentación necesaria para la realización de este tipo de ensayos de mayor componente bioquímico, hizo necesaria la colaboración con el Departamento de bioquímica de la Universidad de Turku (Finlandia), uno de los grupos participantes dentro del proyecto ACUSEP.

Esta colaboración concluyó con una estancia corta en esta universidad para desarrollar el trabajo realizado en esta parte de la memoria. Fueron ellos los encargados de enseñarnos los conceptos y metodología básica necesaria para llevar a cabo los ensayos con nuestros ligandos, y poder testar su actividad como sensores para la determinación de material genético bacteriano

Para la puesta a punto del método, desarrollado por la universidad de Turku, inicialmente se usaron como referencia el ligando antena y el quelato portador de iones de Europio representados en la Figura 3.26.

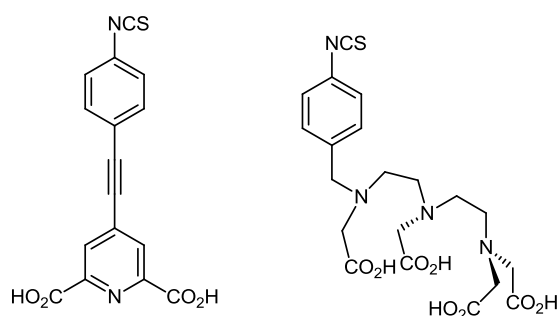


Figura 3.26 Ligando antena y portador de iones de referencia

Posteriores modificaciones sobre la estructura del portador de iones concluyeron en el uso del triácido con estructura tetraazamacrocíclica, (Figura 3.27) como estructura óptima para este tipo de estudios y cuya síntesis se describió en el Esquema 3.22 (pag. 73).

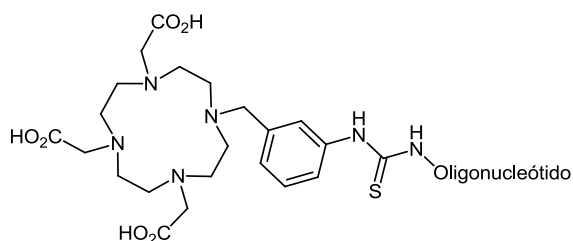


Figura 3.27 Quelato portador de iones ICC

La presencia del núcleo aromático en la estructura, que potencialmente puede actuar como sensibilizador del ion lantánido, no plantea mayores problemas ya que ni su

intensidad de emisión ni la longitud de onda de excitación que habría que emplear suponen una interferencia sobre la señal correspondiente a la sensibilización del ion lantánido obtenida por la excitación del ligando antena.

Reacciones de conjugación

Tal y como se ha comentado, todos los ligandos, tanto ligando antena como portador de iones, precisan de un punto de anclaje para las reacciones de conjugación sobre el oligonucleótido. Este anclaje se consigue a través del grupo isotiocianato que presentan todos los ligandos en su estructura.

Siguiendo el procedimiento utilizado por la universidad de Turku se conjugan las diferentes antenas sintetizadas sobre secuencias sintéticas complementarias a material genético de una bacteria del género *Pseudomona*. Estas secuencias se seleccionaron mediante estudios del genoma de las principales bacterias causantes de sepsis, con el objetivo de que fuesen diferentes para cada bacteria a analizar. Esta parte del proyecto fue desarrollada por el grupo participante en el proyecto de la Universidad de Turku.

Para poder llevar a cabo las reacciones de conjugación es necesario partir de un oligonucleótido complementario al bacteriano y dotado de un grupo amino sobre el que se fija el isotiocianato dando lugar a una nueva función tiourea. La optimización del sistema se realizó sobre la base de tres variables principales:¹²⁴

1. Elección de la base sobre la cual introducir la función amino
2. Posición de esta base respecto del extremo de la secuencia
3. Naturaleza de la cadena separadora sobre la cual se sitúa el grupo amino alejado de este modo de la base

Todos estos parámetros son fundamentales para conseguir la máxima sensibilidad del método, maximizando la señal del lantánido.

La conjugación se produce cuando el grupo isotiocianato del ligando antena o del compuesto portador de iones lantánidos, reacciona con el resto amino libre del oligonucleótido mediante la formación de un enlace tiourea.

Resulta importante destacar en este punto la importancia relativa de los estudios fotofísicos llevados a cabo sobre los ligandos antena preparados. Estos estudios no pueden, como ya se ha comentado, ser tomados como una medida definitiva de la calidad de los distintos cromóforos como sensibilizadores de los iones lantánidos. Como se ha discutido las diferencias entre grupos amino e isotiocianato resultan importantes

¹²⁴ U. Karhunen, M. Soikkeli, S. Lahdenperä, T. Soukka, *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 772, 87.

y no siempre seguían la misma tendencia cuando se comparaban sustituyentes iguales. La función isotiocianato no es, la que finalmente esté unida a la antena conjugada al oligonucleótido sino que esta se transforma, como se acaba de comentar, en una función tiourea con demanda electrónica distinta a la función isotiocianato y que por consiguiente puede conducir a resultados no siempre coincidentes con los de grupos amino e isotiocianato estudiados. Aunque el objetivo es hacer un análisis del comportamiento del mayor número posible de antenas, el gran número de moléculas preparadas, el tiempo y trabajo requerido para realizar las conjugaciones e hibridaciones con todos ellos es demasiado importante y en esta memoria se presentan los resultados obtenidos con algunos de ellos. Lo que se ha pretendido con este proyecto ACUSEP es poner a punto una prueba de concepto del sistema en su conjunto, dejando la optimización en las diferentes parcelas del proyecto para una fase posterior.

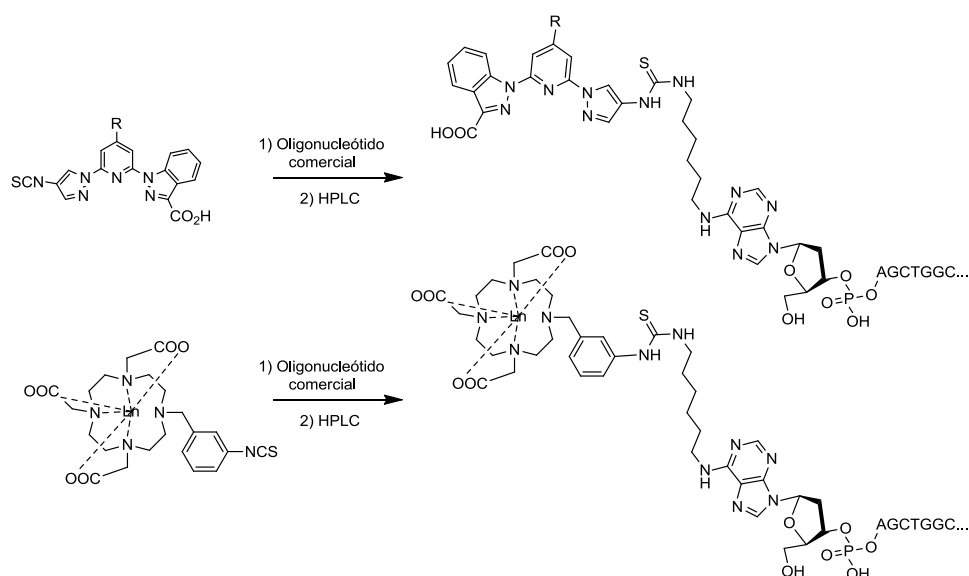


Figura 3.28 Reacciones de conjugación de un ligando antena y el Quelato ICC sobre una base terminal dotada con un separador hexilamino en un oligonucleótido

Los ligandos con el grupo isotiocianato se disuelven en la mínima cantidad de DMF, en tubos Eppendorf estériles. Para su total disolución los tubos Eppendorf se sumergen en un baño de ultrasonidos durante 20 segundos. Tras esto, los tubos se incuban a 50°C con agitación continua durante treinta minutos.

La reacción de conjugación se realiza a pH básico en una disolución tampón carbonato/bicarbonato sódico donde la DMF nunca debe superar el 50% del volumen.

Para llevar a cabo la reacción de conjugación se emplea una relación molar 20:1 de quelato portador de iones respecto al oligonucleótido correspondiente. En el caso de la

antena para conseguir el máximo marcaje del ligando se utiliza una relación molar de 100:1 de antenna respecto al oligonucleótido elegido.

La reacción se incuba durante 12 horas a 50°C. En una primera purificación mediante filtración a través columnas de exclusión molecular NAP-5, se separan los productos de mayor peso molecular (oligonucleótido marcado y oligonucleótido libre sin reaccionar) de los de menor peso que se quedan retenidos en ella.

En una segunda etapa de purificación, se aísla el oligonucleótido marcado del oligonucleótido libre mediante HPLC. En la Figura 3.29 se muestra un cromatograma correspondiente a una reacción de conjugación con ligandos antenna.

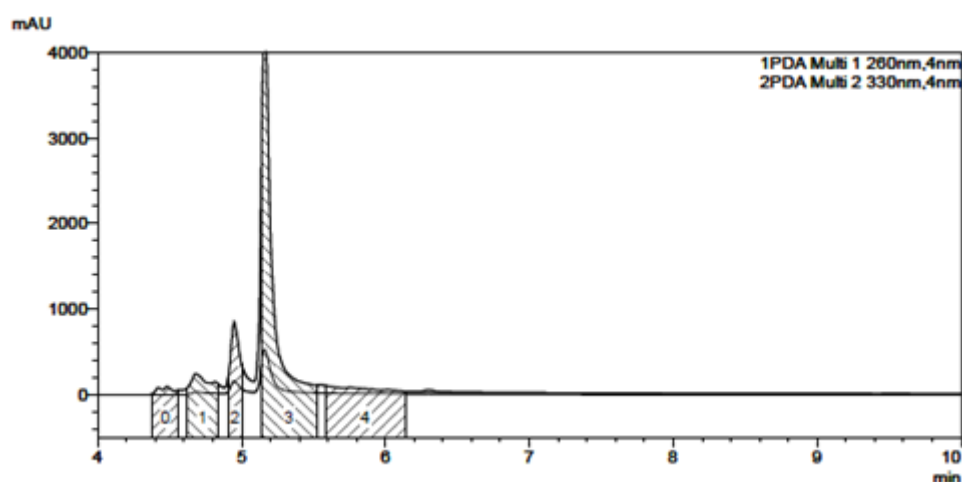
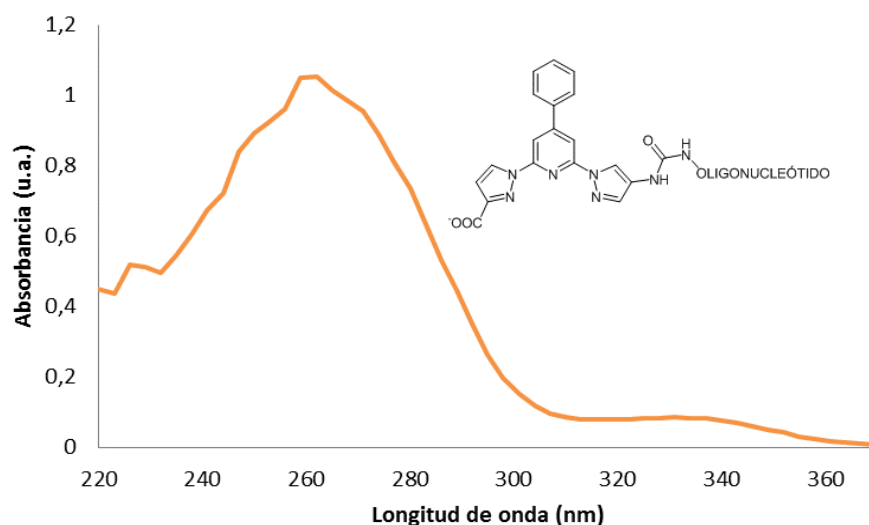


Figura 3.29

Como se observa, además de pequeños picos hay dos picos principales. Un pico con un tiempo de retención de 4.9 minutos correspondiente al oligonucleótido libre, y un pico a 5.2 min. correspondiente al oligonucleótido marcado. Las fracciones una vez recogidas se cuantifican para conocer el grado de marcaje sobre la base de su contenido en ligando antenna. Este valor sirve para valorar la señal en las reacciones de hibridación.

La concentración de oligonucleótido *marcado* se determina mediante el espectro ultravioleta, obtenido en un espectrómetro nanodrop (Gráfica 3.15).



Gráfica 3.15

En el espectro se observan dos máximos, uno en torno a 260 nm que corresponde al absorción de las bases nucleicas, y otro en torno a 335 nm que corresponde a la longitud de onda del ligando antena conjugado al oligonucleótido. A partir de las absorciones relativas a estas longitudes de onda puede determinarse el grado de marcaje de la fracción obtenida en HPLC, y como consecuencia conocer la concentración de producto marcado que se emplea para realizar los ensayos de hibridación con material genético bacteriano.

En el caso de las reacciones de conjugación con el quelato portador de iones (ICC) el procedimiento es similar, pero la determinación del grado de marcaje del oligonucleótido con este complejo se realiza mediante el análisis del contenido en lantánido de la muestra, que se asume está complejoado con el ligando macrocíclico en el oligonucleótido. Esta determinación se realiza siguiendo una valoración de Europio o de Terbio empleando el sistema DELFIA.¹²⁵ En este método se realiza una descomplejación del lantánido que forma un nuevo complejo luminiscente con un ligando sensibilizador (β -dicetona) el cual se aísla del medio mediante una solución micelar y se cuantifica mediante fluorimetría.

¹²⁵ S. Vikström, C. Gripenberg-Lerche, P. Hurskainen, I. Hemmilä. *PerkinElmer Life & Anal. Sciences*.

Las pruebas para la determinación del oligonucleótido marcado han sido llevadas a cabo con los ligandos recogidos en la Figura 3.30, además del quelato portadores de Terbio y Europio que mostramos en la Figura 3.27.

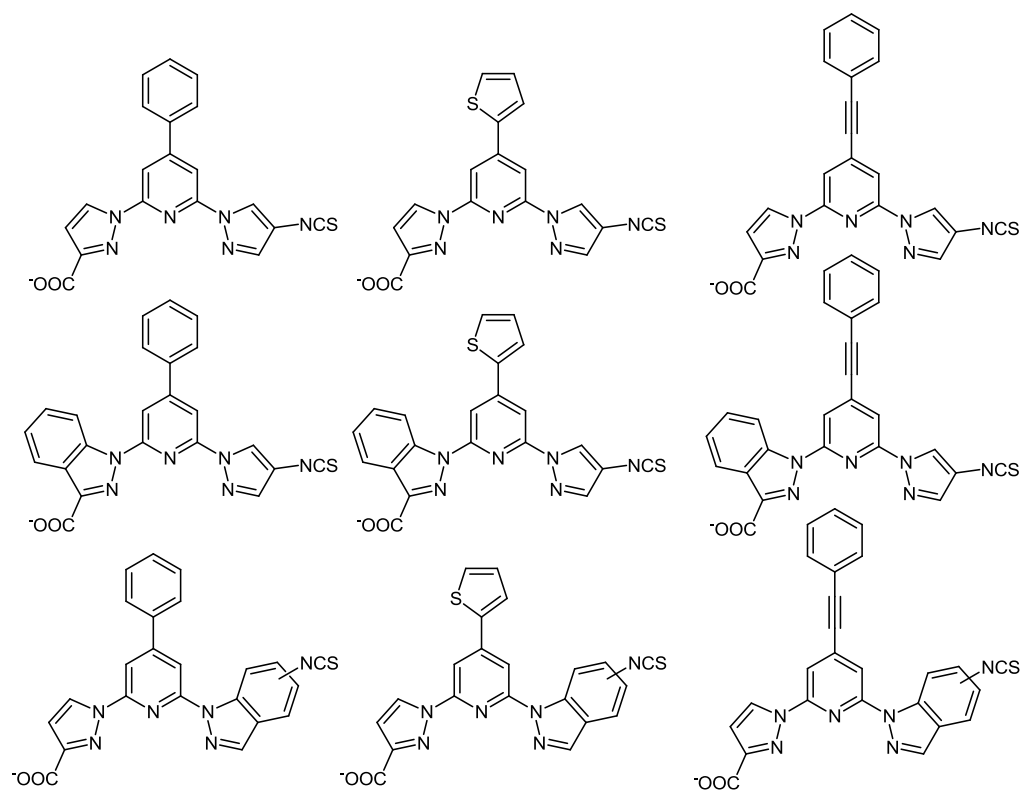


Figura 3.30

La conjugación de estos ligandos con el oligonucleótido se lleva a cabo en las condiciones anteriormente descritas. Antes de realizar la purificación mediante cromatografía de HPLC se comprueba que los las antenas utilizadas no estén contaminados con iones lantánidos que puedan contaminar la columna. La aparición de trazas de Terbio en los ligandos **16c**, **9b** y **9c**, hizo imposible su purificación por cromatografía de HPLC por el alto riesgo contaminación de la columna. Con lo que pese a haber sido conjugados no pudieron ser purificados por HPLC, y por tanto no pudo ser testada su actividad como detectores de ADN bacteriano en las reacciones de hibridación. El resto de ligandos pudieron ser purificados, en la Figura 3.31 se recogen a modo de ejemplo los cromatogramas obtenidos para las antenas **16b** y **L-c**.

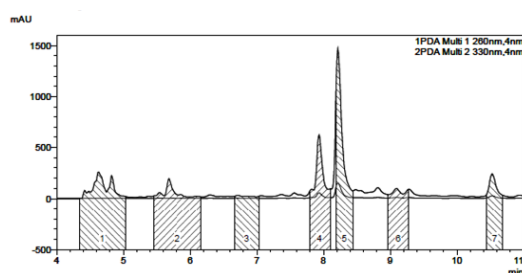
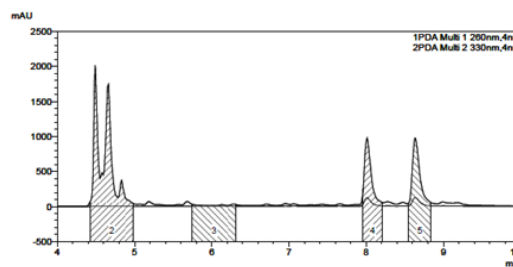
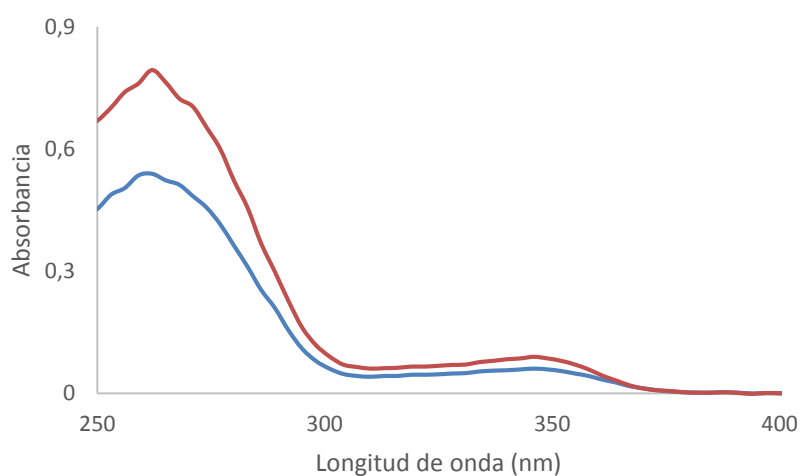
Cromatograma del ligando **L-c**Cromatograma del ligando **16b**

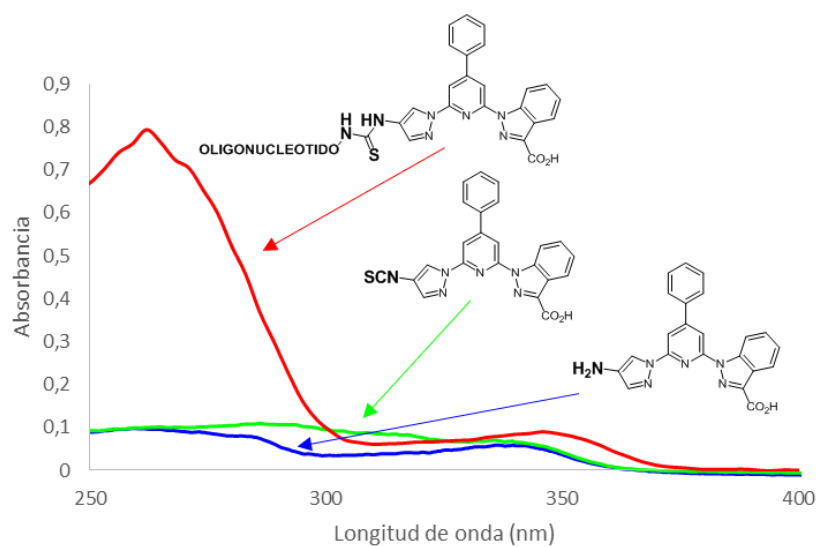
Figura 3.31

Como se puede observar, el oligonucleótido libre aparece como un único pico con un tiempo de retención de 4.5 minutos, los oligonucleótidos marcados con los ligandos antena aparecen aparecen en todos los casos como dos picos a tiempos de retención entre 7 y 9 minutos. La aparición de dos picos con diferentes tiempos de retención puede ser debida a la presencia de dos conformaciones cuaternarias diferentes para el mismo oligonucleótido marcado, puesto que los espectros de ultravioleta muestran los mismos resultados para ambos picos.



Gráfica 3.16

Tras el aislamiento y determinación de distintas fracciones recogidas en HPLC, se seleccionan las óptimas para realizar los ensayos de hibridación. En la Gráfica 3.17 se puede observar el desplazamiento batocrómico que produce la conjugación en la señal de absorbancia del cromóforo



Gráfica 3.17 Espectros de UV de la estructura 4-fenil-6indazilil-2pirazolilpiridina con diferentes funcionalizaciones en posición 4 del anillo pirazólico.

Luminiscencia en las reacciones de hibridación

La confirmación de la validez de nuestros ligandos se determina mediante la correspondiente reacción de hibridación. La complementariedad de bases entre los oligonucleótidos marcados, con el ligando y con el portador de iones, frente a la cadena de ADN bacteriano, produce su hibridación y como consecuencia de la cercanía de ambos oligonucleótidos y la formación del complejo luminiscente.

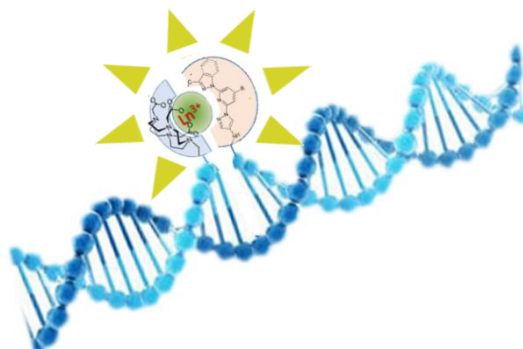


Figura 3.32

En los casos reales, en los que el ADN bacteriano sería aislado del paciente enfermo, la determinación de la señal luminiscente sería determinante a la hora de identificar la bacteria presente en la infección, ya que las secuencias elegidas para los oligonucleótidos solo son complementarias con un solo segmento de una bacteria determinada.

Inicialmente el ADN diana utilizado fue de origen sintético, pero conforme avanzaba el proyecto y ante la necesidad de realizar el estudio genético sobre ADN bacteriano real, se optó por utilizar un fragmento de ADN de la bacteria *Pseudomona Aeruginosa*, con fórmula 5'-CCTGCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGDAGTTAGCCG-3'. Se eligió esta bacteria a partir del estudio genético realizado por la universidad de Turku sobre diferentes bacterias causantes de infecciones sanguíneas.

Las reacciones de hibridación se llevan a cabo frente a concentraciones de oligonucleótido diana de 13.3 nM.

En un primer estudio se mide la intensidad de emisión de fosforescencia a 615 nm. y 545 nm., correspondientes a los iones de Europio y Terbio respectivamente, al excitar a 330 nm.

A nivel práctico, se utiliza un lector de microplacas que permite medir la intensidad de la señal de Eu y Tb de diferentes disoluciones, pudiéndosele aplicar ciclos de agitación y temperatura, como el que se muestra en la Imagen 3.1.



Imagen 3.1

Para su medida, se preparan disoluciones de los oligonucleótidos marcados con la antena y el portador de iones en relación equimolar. Entonces se añade la disolución portadora del oligonucleótido bacteriano “target”.

Las reacciones se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente tras lo cual se mide la señal luminiscente usando los canales de Europio y Terbio. Tras una segunda incubación de 20 minutos a 50°C, las disoluciones se llevan a temperatura ambiente y se vuelven a medir las señales de Europio y Terbio.

Con el objetivo de eliminar la posible interferencia de fondo que pueda haber en la disolución, así como para determinar la luminiscencia que pueda haber de la formación del complejo sin que haya hibridación con el oligonucleótido diana, se preparan disoluciones de igual concentración pero sin *target*.



Figura 3.33

En la Figura 3.33 se muestran los resultados de la actividad de los ligandos antena al tras la reacción de hibridación con el oligonucleótido portador del Eu<ICC>. Se puede observar que los tres ligandos ensayados tienen una buena respuesta en el ensayo siendo el oligonucleótido que porta al ligando **16a**, el que mejores resultados presenta

para los ensayos de hibridación. Sin embargo, estos resultados pese a sus valores positivos no son comparables a los obtenidos para la reacción de hibridación con el portador de Tb<ICC>, que se muestran en la Figura 3.34.

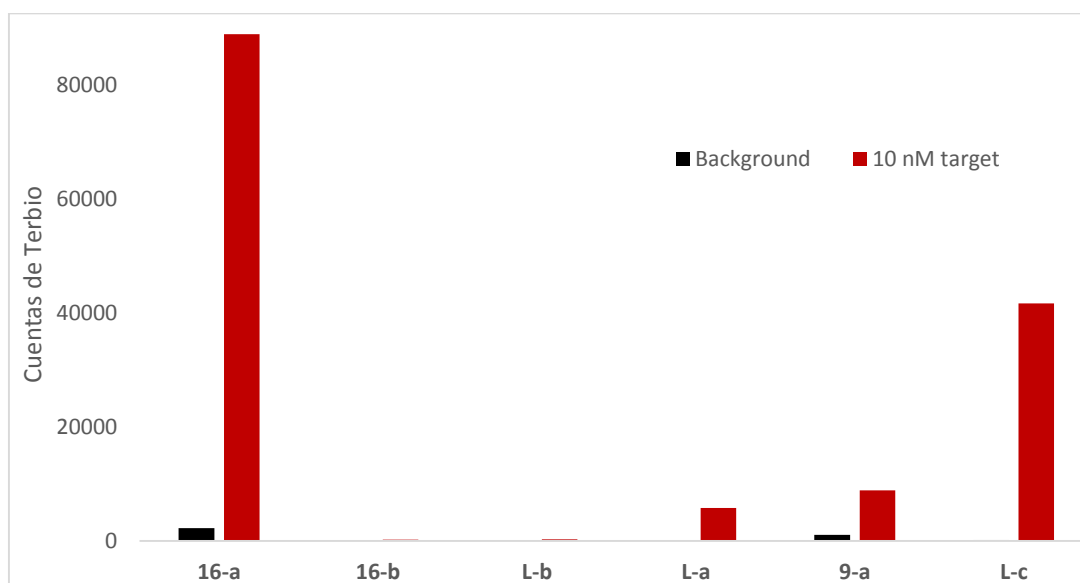


Figura 3.34

En los ensayos de hibridación para la formación de complejos de Terbio, las intensidades registradas son mayores que las registradas para los complejos de Europio. Se puede observar que los ligandos antena siguen la misma tendencia, siendo los ligandos **16a** y **L-c** los que mejores resultados muestran. En cambio los ligandos que presentan un grupo tienilo en la estructura tienen bajos valores de intensidad en las reacciones de hibridación.

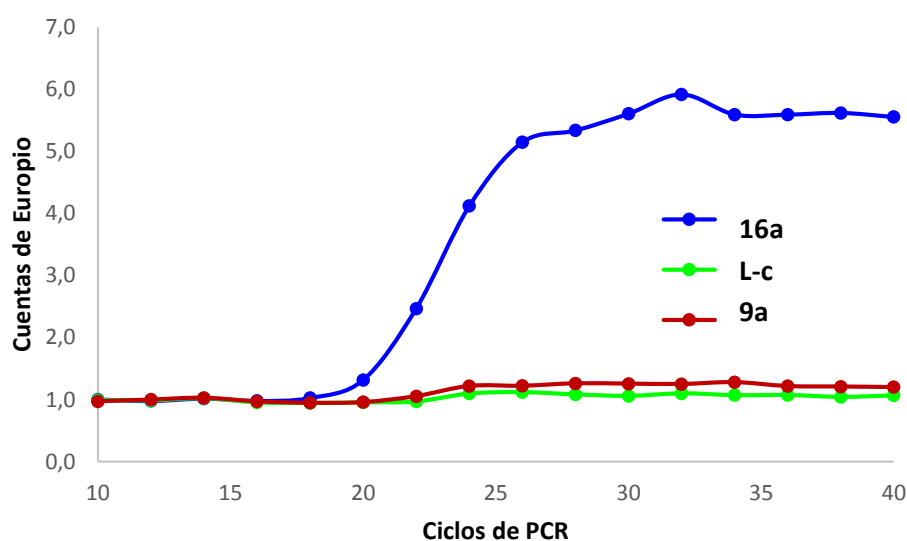
	16a	L-c	9a	L-a	16b	L-b
Int. Eu (u.a.)	6217	2806	637	40	--	--
(%)	100%	45%	10%	0%	--	--
Int. Tb (u.a.)	88880	41661	8848	5770	240	268
(%)	100%	45%	10%	7%	0,2%	0,2%

Tabla 3.18

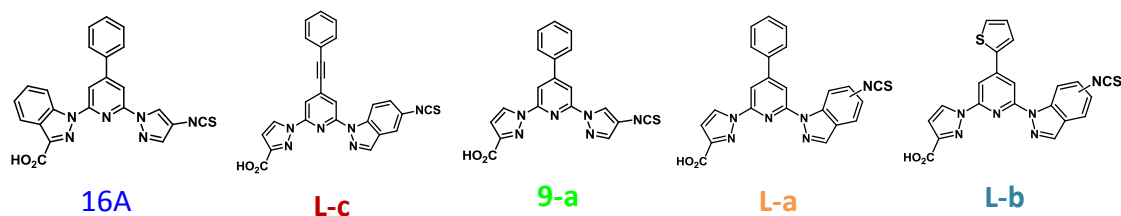
La Tabla 3.18 recoge los valores de intensidad y los porcentajes respecto al mejor ligando de cada serie, que en ambos casos es el ligando **16a**. Es interesante observar como los ligandos estudiados siguen la misma tendencia en los estudios de hibridación.

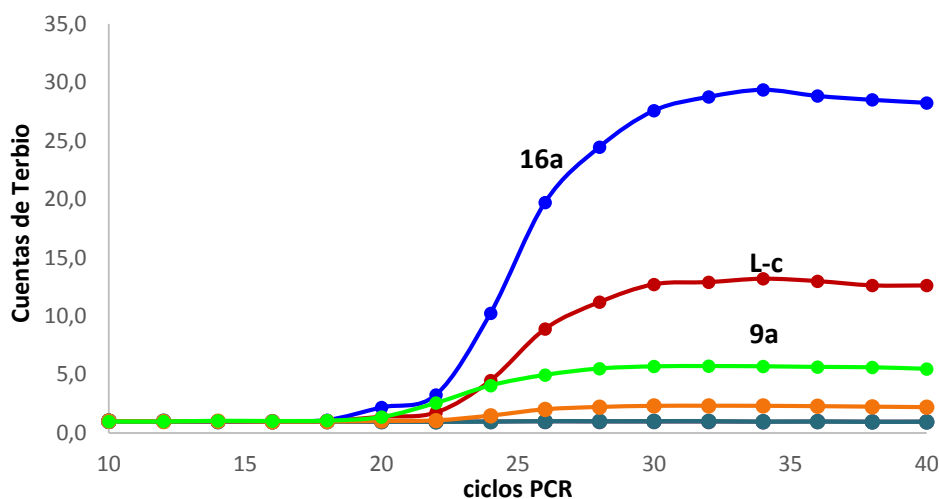
Para de minimizar la emisión de fondo registrada por la complejación sin que las sondas estén conjugadas en el target, se emplea la técnica de PCR a tiempo real (RT-PCR). En

ella se realiza la PCR del oligonucleótido en un termociclador, el cual tiene capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el cromóforo excitado tras los ciclos de amplificación. De esta manera en la etapa de hibridación cuando los dos cromóforos, aceptor y donador, están formando un complejo ternario se puede detectar la luminiscencia.



Gráfica 3.18





Gráfica 3.19

Los resultados de PCR se muestran en la Gráfica 3.18 y Gráfica 3.19, corresponden a los ensayos con de Europio y Terbio, correspondientemente.

Como se puede observar, en el caso de la Gráfica 3.18, que corresponde a los ensayos con Eu que al igual que en los ensayos de hibridación los ligandos antena ensayados pese a ser positivos para este ion, al ser comparados con el ligando de referencia que se emplea en este tipo de ensayos y que está representado en la Figura 3.26, las intensidades obtenidas en PCR son menores. Esto es debido, como se ha podido observar en el estudio fotofísico del capítulo 3.2, a que nuestros ligandos son óptimos para el ion Terbio, y sin embargo el ligando de referencia, derivado del ácido picolínico ha sido optimizado para la complejación de iones de Europio, aunque tiene limitaciones derivadas de su baja absorptividad o de la longitud de onda de excitación empleada para la emisión del Europio.

Al analizar los resultados obtenidos en la PCR con el Tb<ICC>, los valores obtenidos son superiores a los del ligando utilizado de referencia en la universidad de Turku para la formación de complejos de Terbio (Figura 3.35). Los resultados siguen la misma tendencia observada en los ensayos de hibridación, siendo el ligando **16a** el que muestra los mejores resultados, seguido del ligado **L-c** y **9a**.

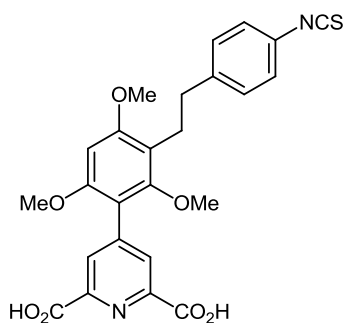


Figura 3.35 Ligando referencia en los complejos de Tb

La Tabla 3.19 recoge porcentajes relativos de los ligandos en los ensayos de PCR para los complejos de Terbio y de Europio.

	16a	L-c	9a	L-a	16b	L-b
Int. Eu (%)	100%	6%	4%	-	-	-
Int. Tb (%)	100%	45%	20%	6%	0%	0%

Tabla 3.19

Al hacer un estudio comparativo señal-estructura, se pueden hacer dos valoraciones una en función del sustituyente en 4 de la piridina y otro en función de los anillos heterociclos presentes en la estructura quelante. Para evaluar la naturaleza del cromóforo se elige la serie de los ligandos derivados de la indazolindazolpiridina representados en la Figura 3.36, ya que en las otras series no pudieron ser ensayadas debidas al problema de contaminación de Terbio presente en algunos ligandos como ya se dijo.

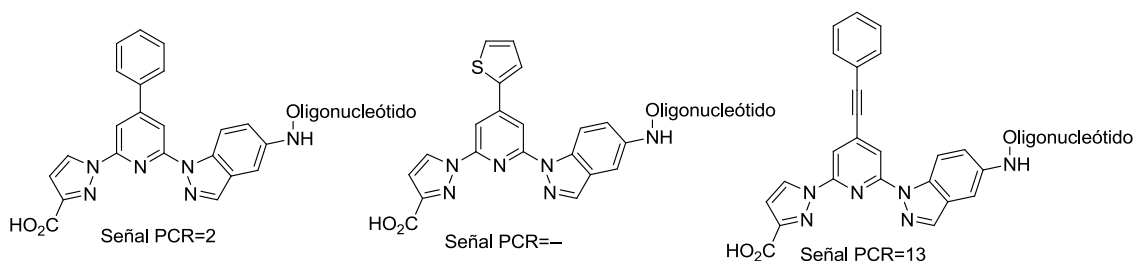


Figura 3.36

Según los resultados obtenidos para estos ligandos en los ensayos de hibridación y PCR, tanto con Europio como con Terbio, el ligando **L-c** que tiene el grupo fenilacetileno en posición 4 de la piridina es el que presenta los valores más altos. En el caso de los ensayos con Eu<ICC> es el único ligando de la serie que muestra resultados positivos, aunque tienen baja intensidad. En cambio para los ensayos con Tb<ICC> este ligando presenta altos valores, mayores que los del ligando que tiene un fenilo como sustituyente de la piridina, que también presenta valores positivos. El ligando portador del grupo tienilo en la piridina apenas registra señal en los ensayos a los que fue sometido.

Que el ligado **L-c** presente las mejores propiedades de emisión, pone de manifiesto que tanto el grupo $-NH_2$ como $-NCS$ y la tiourea (enlace producido en la conjugación), tienen un comportamiento completamente diferente ya que este ligando a pesar de mostrar bajos resultados de emisión en el estudio de sus complejos, es el que mejores resultados tiene al ser conjugado

Al hacer una valoración según la estructura que posee el ligando al tener el mismo sustituyente en 4, se utilizó como referencia los ligandos con el grupo fenilo en posición 4 (Figura 3.37), ya que como hemos dicho anteriormente, hubo tres ligandos que al contener trazas de Terbio no pudieron ser estudiados.

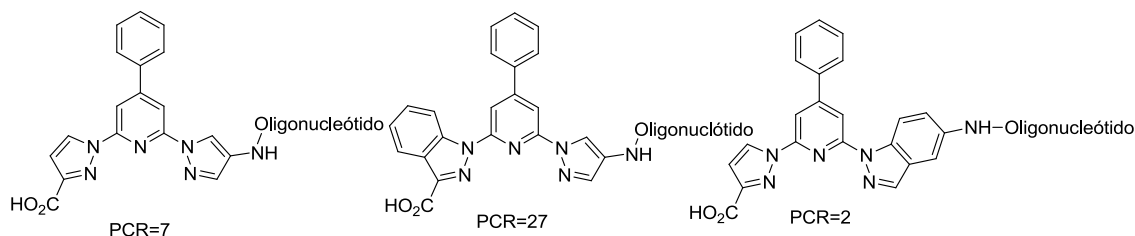


Figura 3.37

Estos ligandos presentan valores positivos en sus ensayos de hibridación con Eu<ICC> y Tb<ICC>. En el estudio de hibridación con ambos iones se observa que la estructura que mejor sensibiliza al ion lantánido es la estructura indazolpirazolpiridina, en la que el anillo de indazol tiene la funcionalidad carboxilato y el anillo de pirazol sirve como puente con el oligonucleótido (**16a**). Estos resultados coinciden con los obtenidos en los estudios fotofísicos con éteres corona donde los ligandos con este tipo de estructura destacaban como sensibilizadores de los iones lantánidos.

En los ensayos de PCR de Europio, solo fueron ensayados los ligandos **16a** y **9a** ya que las intensidades para **L-a** eran muy bajas en los ensayos de hibridación. En estos ensayos se observa al igual que en la hibridación que la actividad del ligando **16a** es superior a la del resto de ligandos. En el caso de los ensayos de PCR de Terbio los resultados siguen la misma tendencia, aunque registrando mejores valores en intensidad.

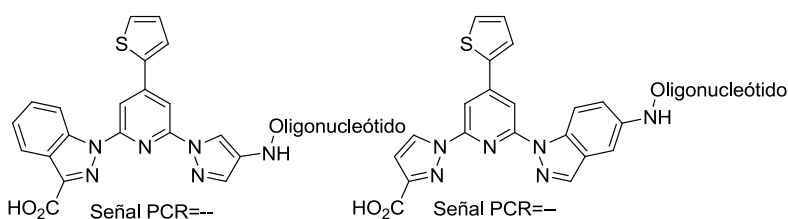


Figura 3.38

De los valores obtenidos también se puede deducir que las estructuras con tiofeno en posición 4 de la piridina no son óptimas para este tipo de ensayos, ya que no presentan señales considerables ni en PCR ni en el estudio de luminiscencia (Figura 3.38).

A la vista de los resultados obtenidos en los estudios de hibridación se puede concluir que las estructuras tipo indazolpirazolpiridina en las que el grupo quelante está en el anillo pirazólico sensibilizan de forma más efectiva a los iones lantánidos, de entre los

tres tipos de estructuras testadas. Además, en el estudio de la influencia del cromóforo se observa que el ligando que posee el grupo fenilacetileno como cromóforo posee las mejores propiedades emisivas. Con estos datos se puede proponer como candidato idóneo para este tipo de ensayos la estructura **16c** mostrada en la Figura 3.39, ya que combina las dos mejores características de los estudios de optimización de las estructuras. Esta estructura pese a haber sido sintetizada no ha podido ser testada, ya que contenía trazas de Terbio.

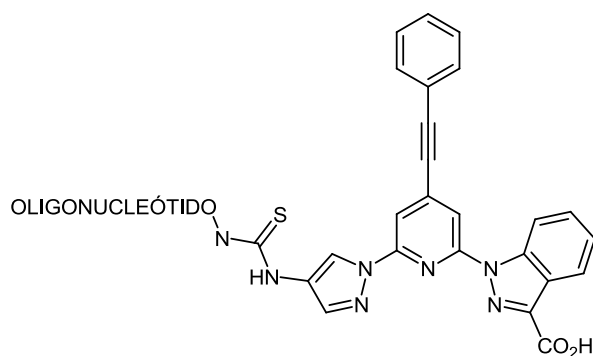


Figura 3.39

4. Ligandos derivados del ácido iminodiacético y propiedades luminiscentes de sus complejos con lantánidos.

Desde que se publicaron los primeros podandos tetracarboxílicos, por nuestro grupo de investigación, han sido numerosas las publicaciones en las que aparecen derivados de este tipo de ligandos gracias a sus buenas propiedades complejantes y luminiscentes.

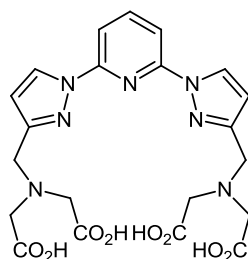


Figura 4.1

Estos ligandos, están formados por un cromóforo basado en el sistema bispirazolpiridina (1-bpp) y por dos unidades de ácido iminodiacético, las cuales actúan como agentes complejantes. Creando una cavidad en la que el ión lantánido puede alojarse de manera efectiva y donde su esfera de coordinación queda saturada y aislada de interacciones con el disolvente. Como consecuencia de la efectividad en la coordinación de estos ligandos, presentan buenos rendimientos cuánticos para sus complejos de Eu, y sobre todo para los de Tb. Otras aproximaciones a este tipo de estructuras, han sido sintetizados por nuestro grupo de investigación, en los se introdujeron diferentes modificaciones de la unidad cromófora, para estudiar su influencia.¹²⁶

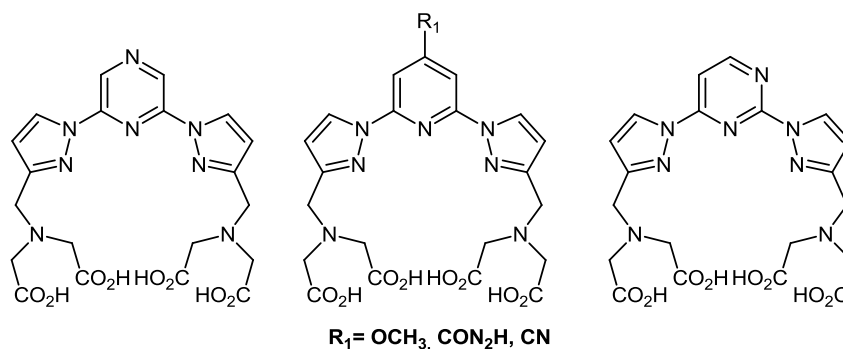


Figura 4.2

De modo análogo diferentes autores han preparado distintas estructuras cromofóricas datándolas de restos iminodiacético,¹²⁷ algunas con excelentes resultados,¹²⁸ como la representada en la Figura 2.3 que presenta un rendimiento cuántico cuantitativo.

¹²⁶ Tesis doctoral de Rosa Sedano, **2001**

¹²⁷ P. Kadjane, M. Stark, F. Camerel, D. Hill, N. Hidebrandt, R. Ziessel, L.J. Charbonniere. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 4601.

¹²⁸ J. Yuan, G. Wang, K. Majima, K. Matsumoto. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1869.

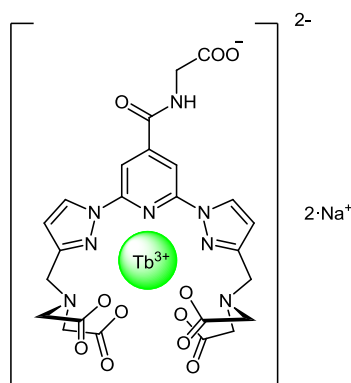


Figura 4.3

Continuando con este trabajo y aprovechando las favorables condiciones de reacción que ofrece el acceso ortogonal a derivados trisustituídos de piridina, se plantea en esta tesis doctoral, la síntesis de nuevos derivados del sistema bispirazolpiridina, para el desarrollo de una nueva generación de marcadores luminiscentes con complejos de iones lantánidos y su posible aplicación en el campo del diagnóstico clínico.

Como ya hemos visto, el empleo de la 4-bromo-2,6-difluoropiridina como producto de partida, se ha revelado como un candidato perfecto para la síntesis de estructuras con diferentes funcionalizaciones en las posiciones 2, 4 y 6 de la piridina. En el contexto de la síntesis de ligandos derivados de los ácidos bisiminodiacéticos (Figura 4.1), la posibilidad de introducir nuevos grupos cromóforos en posición 4 de la piridina y combinarlos con restos de pirazoles e indazoles, se plantea como un reto sintético interesante que puede a su vez mejorar las propiedades luminiscentes de algunos de los ligandos sintetizados hasta el presente.

Las estructuras homologas a las basadas en 2,6-bispirazolpiridina, donde se sustituyen los anillos de pirazol por anillos de indazol son interesantes ya que estos ligandos tienen una “mordida” o cavidad quelante similar a la de los análogos de bispirazolpiridina y además, este esqueleto de bisindazolpiridina continúa teniendo un átomo de Bromo en posición 4 de la piridina que es susceptible de reaccionar con ácidos borónicos y aril-etinilos, lo cual permitirá hacer un estudio comparativo de las propiedades fotofísicas de estos ligandos respecto a sus análogos bispirazolilderivados, dejando una puerta abierta para su futuro estudio como marcadores luminiscentes y su aplicación en inmunoensayos de modo similar a estos.

4.1. Síntesis de ligandos derivados del ácido iminodiacético.

4.1.1. Síntesis de los ligandos derivados de bispirazolpiridina.

Sobre la base de los objetivos propuestos y con las oportunidades sintéticas que nos ofrece el uso de la 4-bromo-2,6-difluoropiridina se propone como ruta sintética para la obtención de los ligandos nonadentados la representada en la **FIGURA 4.4.**

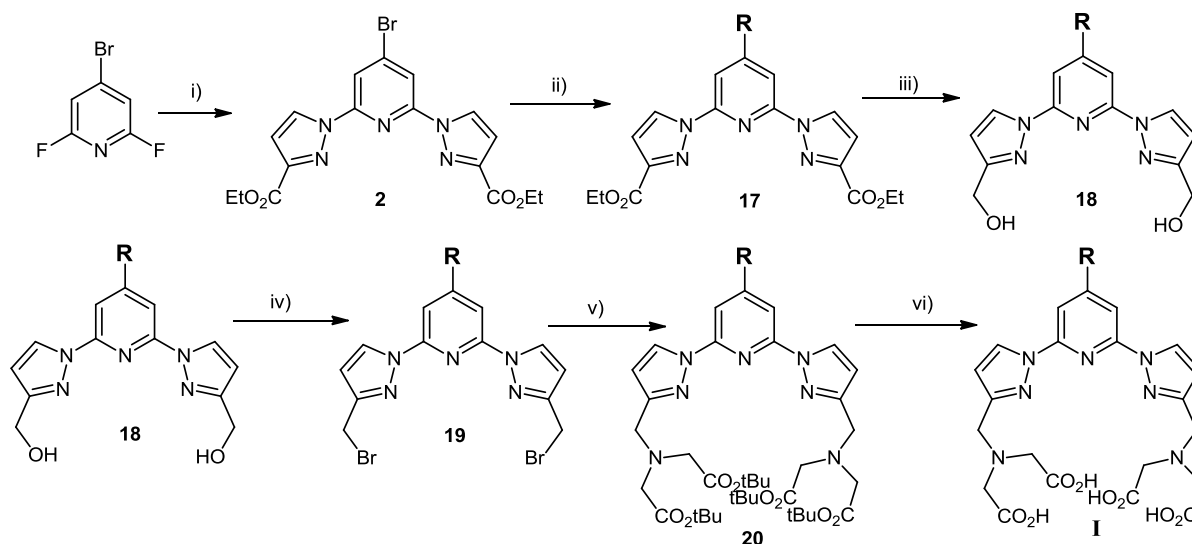
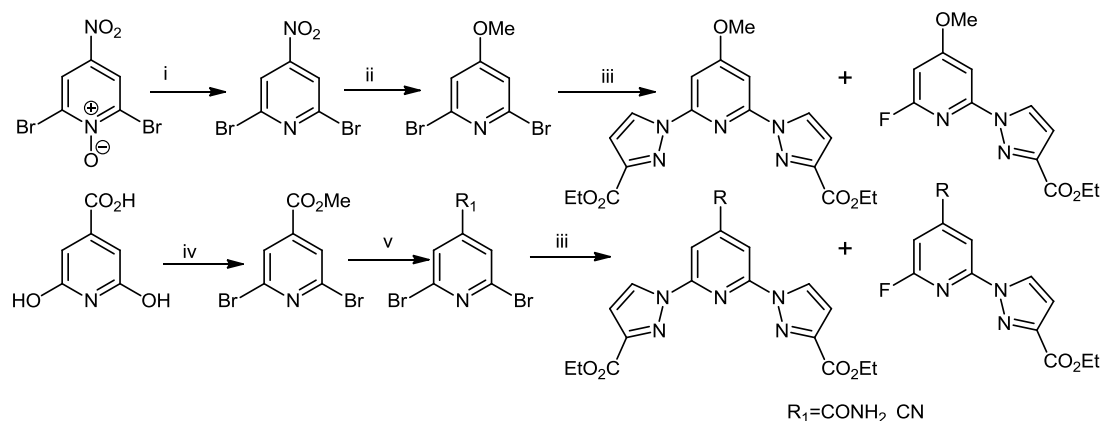


Figura 4.4. Ruta sintética propuesta i) 2 eq. 3-etoxicarbonilindazol, NaH, DMF, 50°C. ii) R-B(OH)₂, THF, KOH, Pd(pph₃)₄, 130°C MW ó feniletinilo, THF, Et₃N, PdCl₂(PPh₃)₂, CuI, 80°C, 20h. iii) LiAlH₄, THF. iv) PBr₃, CH₃CN. v) NH(CH₂CO₂^tBu)₂, CH₃CN. vi) TFA. CH₂Cl₂

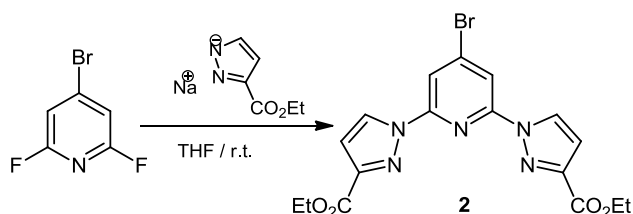
Este esquema sintético es esencialmente el mismo que el empleado originalmente en nuestro grupo para el acceso a estos ligandos tetraácidos, en cuanto a la elaboración de la cadena sobre los anillos de pirazol. Sin embargo la sustitución sobre las posiciones 2 y 6 de la piridina aporta la ventaja de la mayor reactividad de las posiciones fluoradas respecto a las bromadas empleadas en el diseño original y la introducción del sustituyente sobre la posición 4, que resulta mucho más eficaz y versátil a partir de un átomo de bromo en esta posición, que a partir de sustituyentes con poca variedad estructural, como los desarrollados por nuestro grupo y recogidos en el Esquema 4.1.



Esquema 4.1 i) PBr_3 , CHCl_3 . ii) NaOMe , THF. iii) Pirazol, K (metal), Diglime. iv) POBr_3 . $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$. v) (1) NH_3 (CONH_2). (2) P_2O_5 . Tolueno(CN)

Como se ha discutido la presencia de un átomo de bromo permite su sustitución de modo ortogonal respecto de las otras dos posiciones reactivas y abre un enorme campo de funcionalización mediante reacciones de acoplamiento vía organometálicos.

De este modo y tal y como se ha recogido en el Capítulo 3, el primer paso de reacción consiste en la sustitución de los dos átomos de flúor por los anillos de pirazol, empleado en forma de pirazolato sódico. Al igual que en los derivados monosustituídos la reacción transcurre a temperatura ambiente con buenos rendimientos, utilizando para ello como THF como disolvente (Esquema 4.2).



Esquema 4.2

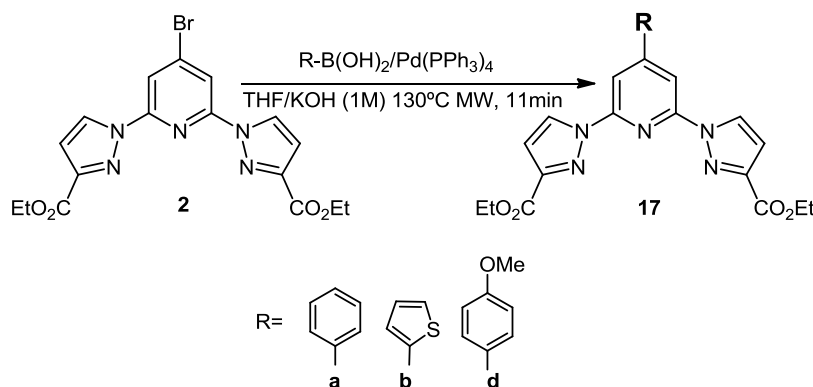
La reacción transcurre de forma regioselectiva, obteniéndose como único producto la 4-bromo-2,6-bis-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)piridina (**2**) con un rendimiento del 80%.

La estructura puede determinarse por espectroscopía de ^1H -RMN por la aparición de las dos señales pirazólicas a 8.55 y 7.01 ppm, y la desaparición de las señales características de los protones de la piridina próximos a átomos de flúor.

A partir del 4-bromo-2,6-bis-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)piridina (**2**), se llevan a cabo las reacciones de acoplamiento C-C catalizadas con paladio, Suzuki-Miyura y Sonogashira. Al igual que al realizar esta reacción para introducir diferentes grupos cromóforos en el capítulo anterior, el uso de microondas en la reacción reduce de forma drástica los

tiempos de reacción. El empleo de reactores de microondas sellados permite un mayor control de la presión y temperatura, lo cual facilita su reproducibilidad.

La reacción de Suzuki para la síntesis de estos nuevos ligandos se lleva a cabo siguiendo el procedimiento general mostrado en el Esquema 4.3.



Esquema 4.3

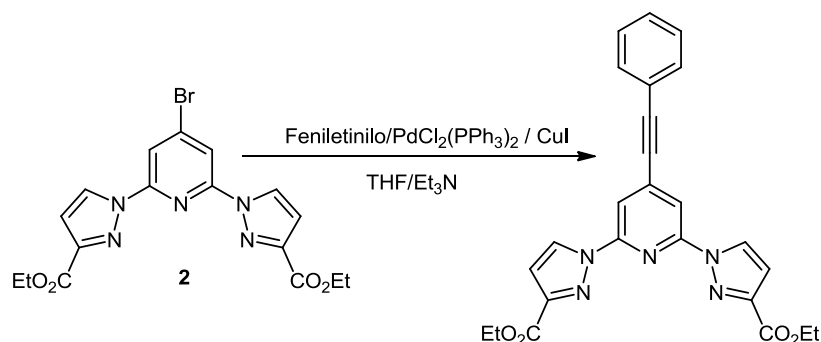
Los rendimientos de estas reacciones se muestran en la Tabla 4.1.

Ligando	17a	17b	17d
Rendimiento (%)	63	93	83

Tabla 4.1

Los compuestos obtenidos, en este caso como diésteres, son fácilmente caracterizables por espectroscopia de resonancia magnética de protón, en los que aparecen las señales características de los anillos aromáticos introducidos. Así, el ligando **17a** muestra dos multipletes característicos (7.84 y 7.52 ppm) correspondientes a los 5 protones aromáticos del fenilo. En el ligando **17b** las señales correspondientes al grupo tienilo introducido aparecen como dobles dobletes a 7.79, 7.52 y 7.19ppm y las señales características en el espectro del ligando **17d** aparecen como un singlete que corresponde al grupo metoxilo a 3.89 ppm y como dos dobletes correspondientes a los 4 protones aromáticos a 7.82 y 7.05 ppm.

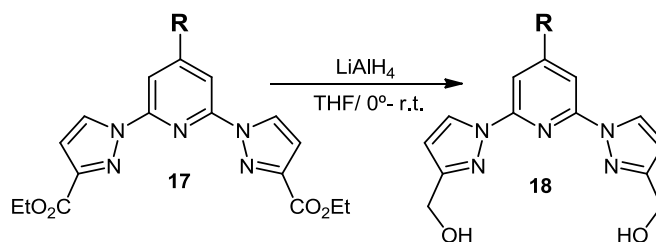
La reacción de Sonogashira se lleva a cabo siguiendo el procedimiento general recogido en el Esquema 4.4



Esquema 4.4

El compuesto **17c** presenta en su espectro de ^1H -RMN, dos multipletes correspondientes a 5 protones a 7.58 y 7.41 ppm.

Siguiendo el Esquema 4.5, la siguiente reacción es la reducción de los grupos éster de los derivados 4-arilsustituídos-2,6-bis(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)piridina. Esta se realiza mediante el tratamiento con hidruro de litio aluminio en THF a 0°C (Esquema 4.5), obteniéndose los correspondientes dioles **18** con buenos rendimientos (Tabla 4.2).



Esquema 4.5

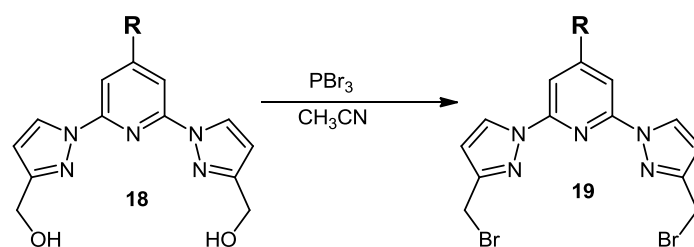
Ligando	18a	18b	18c	18d
Rendimiento (%)	78	92	87	86

Tabla 4.2

La confirmación de la estructura de estos productos se realiza mediante sus espectros de ^1H -RMN, en los cuales las señales de los grupos etilo, desaparecen y se observan las correspondientes a los grupos metileno equivalentes del diol, además de observarse un apantallamiento de los protones H4 y H5 del anillo de pirazol.

La obtención de los derivados 4-arilsustituídos-2,6-bis(3-bromometil-1-pirazolil)piridina se realiza mediante el tratamiento de los dioles (**18**) con tribromuro de fósforo en acetonitrilo seco (Esquema 4.6). El empleo de acetonitrilo como disolvente para este tipo de reacciones no es habitual, sin embargo, en muchos casos la baja solubilidad de alcoholes o dioles en éter etílico conduce a baja reproducibilidad y mediocres resultados de la reacción. El empleo de acetonitrilo (45°C) facilita la disolución del alcohol antes de

la adición del tribromuro de fósforo. Los derivados bromados, **19**, se obtienen con buenos rendimientos como se recoge en la Tabla 4.3, y con la necesaria pureza para poder ser empleados en la siguiente etapa de reacción.



Esquema 4.6

Ligando	19a	19b	19c	19d
Rendimiento (%)	89	83	94	84

Tabla 4.3

La Figura 4.5 muestra el espectro de ^1H -RMN del ligando **19a** donde se puede apreciar el efecto apantallante que produce el átomo de bromo sobre el desplazamiento químico de los protones del grupo metileno, respecto al ligando con el grupo alcohol. En el ligando **18a** los protones metilénicos están a un desplazamiento químico de 4.84 ppm, mientras que en su análogo dibromado, **19a**, estos protones presentan un desplazamiento de 4.57 ppm.

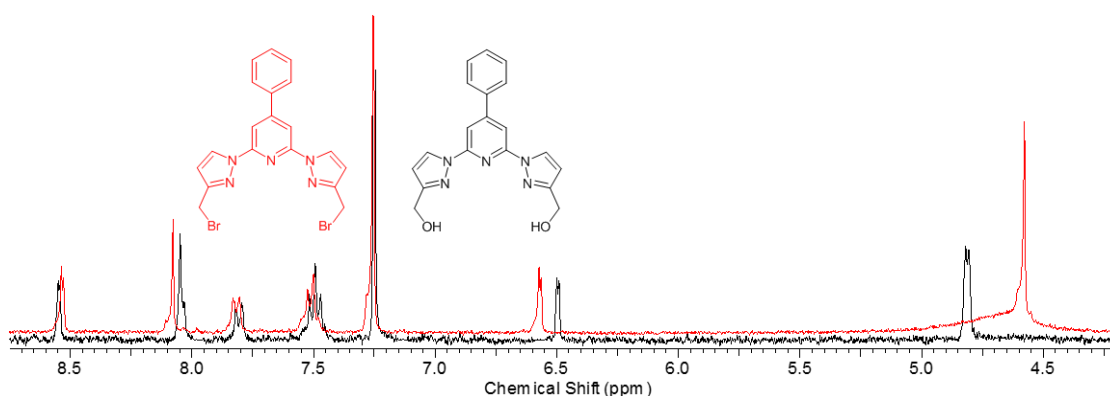


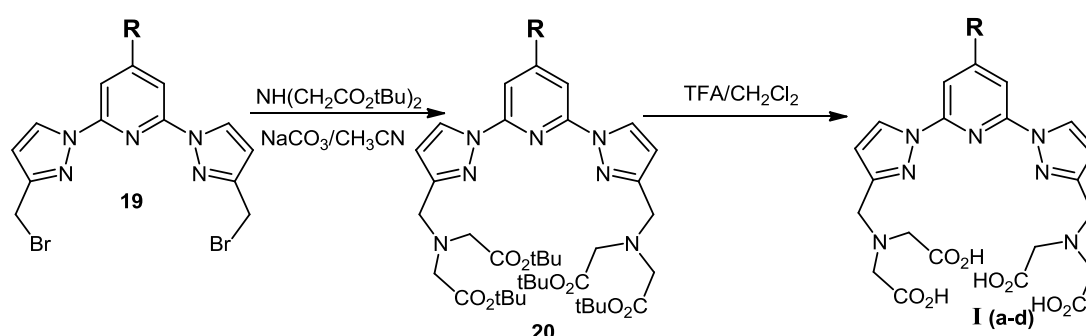
Figura 4.5 Espectro de ^1H -RMN del ligando **18a** (línea negra) y del ligando **19a** (línea roja).

A partir de los derivados dibromados se introducen los restos de iminodiacético en forma de diéster *terc*-butílico, mediante el uso de inimodiacetato de *terc*-butilo en acetonitrilo, siguiendo el procedimiento puesto a punto en nuestro grupo. Se emplean estos ésteres debido a que son fácilmente “hidrolizables” en medio ácido. Esto supone una ventaja frente al empleo de otros grupos ésteres que requieren condiciones básicas de hidrólisis y posterior generación de los ácidos libres a partir del bruto de

saponificación, ya que junto el tetraácido buscado también precipitan sales ácidas de diferente composición.

La purificación de los tetraésteres es muy importante, puesto que la purificación del tetraácido posterior es mucho más compleja, al tratarse de un producto muy polar. La purificación se realiza mediante cromatografía en columna de alúmina. Se emplea alúmina ya que la gel de sílice, debido a su carácter ácido, puede provocar la ruptura parcial o total de los grupos ésteres *tert*-butílicos.

La ruptura de los ésteres *tert*-butílicos se lleva a cabo con ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano. Los tetraácidos (**I a-d**) son aislados mediante su precipitación con éter etílico



Esquema 4.7



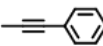
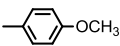
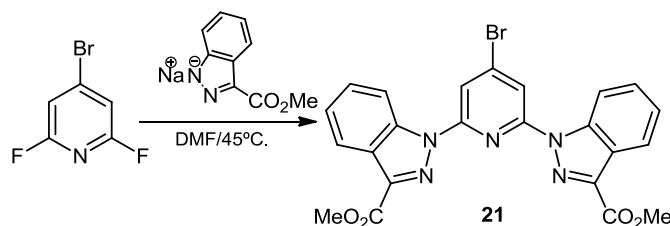
	a	b	c	d
Ligando I				
Rendimiento (%)	57%	64%	65%	59%

Tabla 4.4

4.1.2. Síntesis de los ligandos derivados de bisindazolipiridina nonadentados

La incorporación de los anillos de indazol aporta mayor grado de conjugación a la molécula, lo cual puede modificar las propiedades fotofísicas de los ligandos mejorando, por ejemplo, los máximos de excitación empleados para la emisión de los lantánidos, lo que a igualdad de emisión resulta muy interesante desde el punto de vista de abaratar el material óptico de los bioensayos. Además la incorporación de estos grupos más voluminosos puede ayudar a proteger de manera aún más efectiva al ion lantánido del medio.

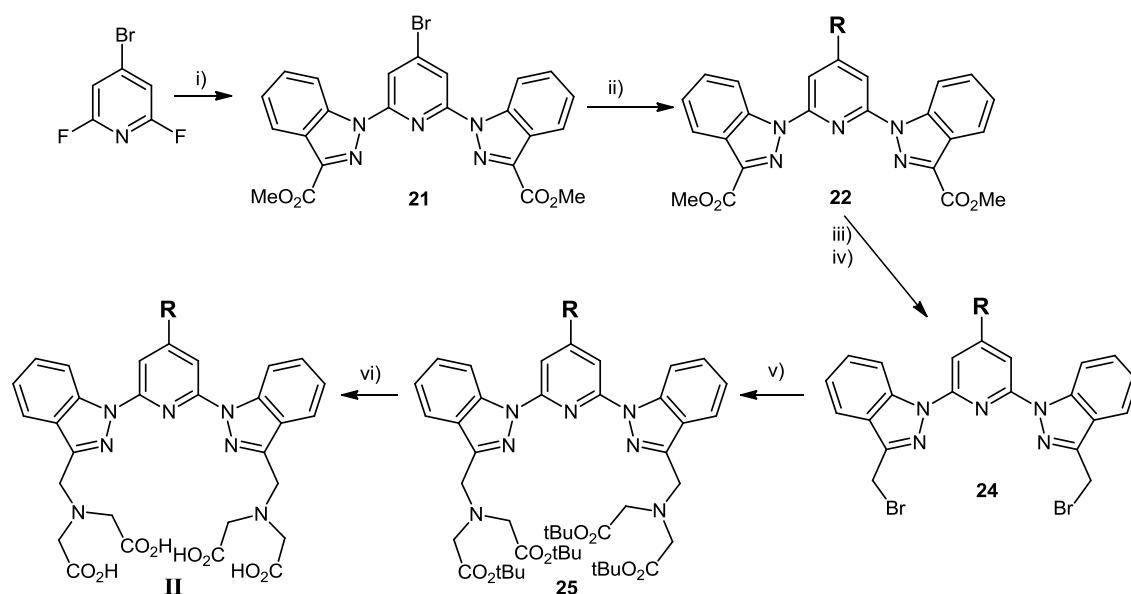
Como se ha puesto de manifiesto en la introducción, pese a las prometedoras propiedades fotofísicas que puedan presentar este tipo de compuestos, los antecedentes bibliográficos son escasos, Ziessel y colaboradores, han descrito la síntesis de este tipo de estructuras a partir de la 4-Bromo-2,6-difluoropiridina, obteniendo el bisindazolilderivado con buenos rendimientos.



Esquema 4.8

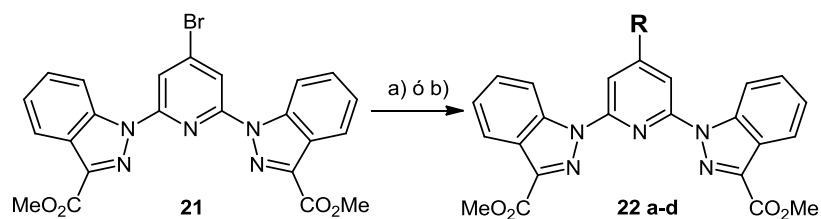
Al contrario, que en la síntesis de las bispirazolipiridinas que requerían condiciones suaves para su síntesis, la síntesis de **21** requiere condiciones más enérgicas, como los son el empleo de DMF a 45°C durante ~4h. La purificación se realiza por centrifugación del producto tras la precipitación con agua. De esta forma, pese a que el empleo de la DMF suele ser evitada ya que su eliminación es tediosa, la precipitación del producto con agua permite obtener el producto puro con buen rendimiento (80%) además de eliminar la DMF de forma sencilla y eficaz.

A la vista de los resultados, y la posibilidad de sintetizar este tipo de compuestos a partir de la 4-Bromo-2,6-difluoropiridina, se propone como ruta sintética a seguir para la obtención de los derivados nonadentados el propuesto en el **ESQUEMA 4.9**, que es paralelo al descrito para las bispirazolipiridinas cuya síntesis se ha descrito en el apartado anterior. Es importante destacar que pese a la menor solubilidad de la 4-bromo-2,6- bisindazolipiridina, esto no constituye ningún problema a la hora de seguir las mismas condiciones sintéticas empleadas para sus análogos bispirazolipiridinas.



Esquema 4.9 i) 2 Eq. 3-Metoxycarbonilindazol, NaH, DMF, 50°C. ii) $R-B(OH)_2$, THF, KOH, $Pd(PPh_3)_4$, 130°C MW ó feniletinilo, THF, Et_3N , $PdCl_2(PPh_3)_2$, CuI, 80°C, 20H. iii) $LiAlH_4$, THF. iv) PBR3, CH_3CN . v) $NH(CH_2CO_2^tBu)_2$, CH_3CN . vi) TFA. CH_2Cl_2

De esta manera una vez sintetizado el 4-bromo-2,6bis(3-metoxycarbonil-1H-indazolil)piridina **21** como producto de partida, el siguiente paso en la ruta sintética son los acomplamientos C-C vía paladio, mediante la reacción de Suzuki o Sonogashira, empleando las condiciones de reacción descritas en el **ESQUEMA 4.10**, que son las mismas que las empleadas para sus análogos bispirazólicos.



Esquema 4.10 a) Reacción de Suzuki; $R-B(OH)_2$, $Pd(PPh_3)_4$, KOH (aq), THF, 130°C 11min. b) reacción de sonogashira; etinilbenceno, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, CuI, THF, Et_3N .

La reacción de Suzuki se lleva a cabo mediante microondas durante 11 minutos a una temperatura de 130°C utilizando THF como disolvente. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice permitió obtener los ligandos **9a,b** y **d**, con buenos y moderados rendimientos.

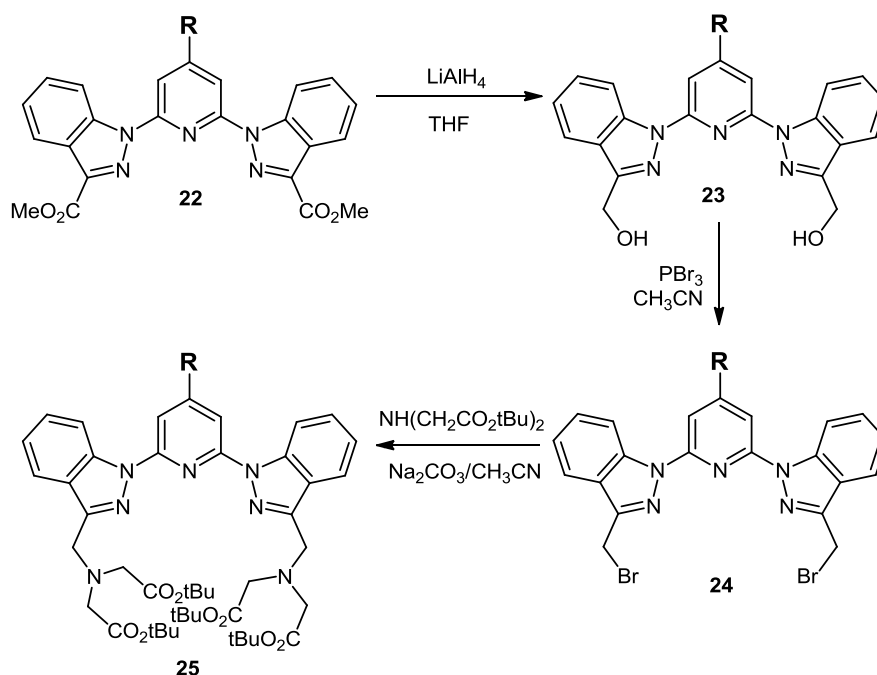
En la reacción de Sonogashira se utilizaron las condiciones descritas en el Esquema 4.9. La reacción se mantuvo a reflujo de THF (80°C) durante 18 horas. Su purificación mediante columna cromatográfica de gel de sílice permitió obtener el producto deseado con un 54% de rendimiento.

Los rendimientos obtenidos para estas reacciones de acoplamiento via paladio se recogen en la Tabla 4.5.

Ligando	22a	22b	22c	22d
Rendimiento (%)	62	59	54	48

Tabla 4.5

La posterior reducción de los ésteres metílicos con LiAlH_4 , permite la obtención de los correspondientes dioles (**22**) que tras una reacción de bromación, empleando tribromuro de fósforo en acetonitrilo, y la reacción de sustitución de los átomos de bromo por grupos diiminodiacetato de *terc*-butilo, en presencia de carbonato sódico, permiten obtener los correspondientes tetraésteres *terc*-butilicos (**24**), como se muestra en el Esquema 4.11.



Esquema 4.11

Los rendimientos de las reacciones en cada uno de sus pasos para los diferentes ligandos se recogen en la Tabla 4.6




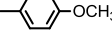
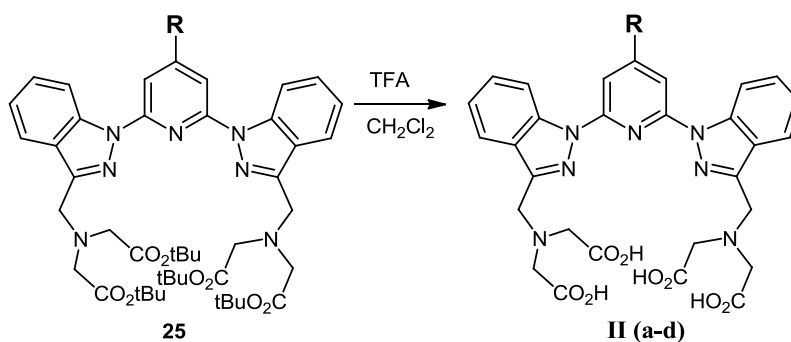
Ligando	a	b	c	d
				
23	94%	91%	86%	89%
24	95%	89%	86%	86%
25	90%	86%	88%	80%

Tabla 4.6

La obtención de los tetraácidos derivados de la 2,6-bisindazolilpirina, tiene lugar tras la ruptura de los ésteres *tert*-butílicos con ácido trifluoroacético (Esquema 4.12). Tras la precipitación con éter etílico y posterior lavado con metanol caliente, se obtienen los correspondientes derivados iminotetrácidos con los rendimientos que se muestran en la Tabla 4.7



Esquema 4.12




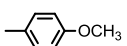
Ligando II	a	b	c	d
				
Rendimiento. (%)	57%	64%	65%	59%

Tabla 4.7

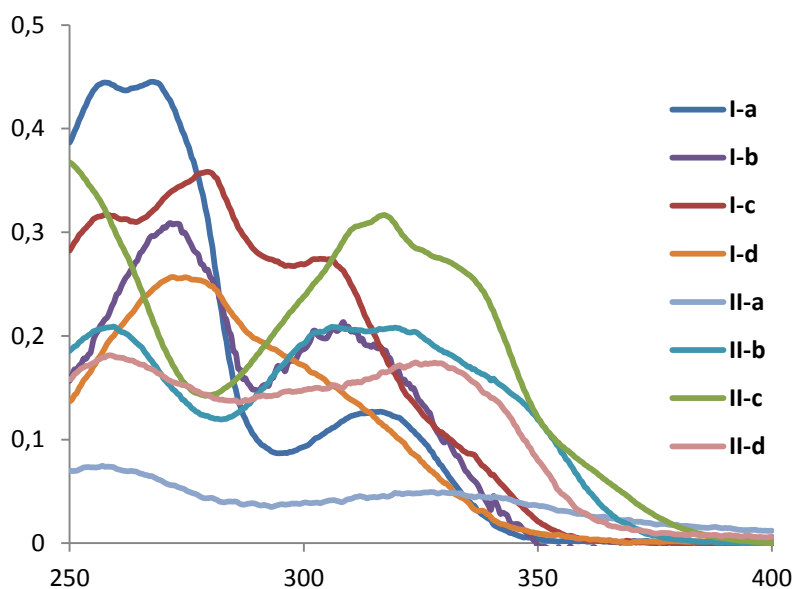
La caracterización de estos compuestos se realiza mediante espectroscopía de ^1H -RMN, utilizando como disolvente agua deuterada básica.

4.2. Estudio fotofísico de ligandos nonadentados.

Se ha llevado a cabo un estudio comparativo de las propiedades fotofísicas de los ligandos derivados de la bispirazolpiridina y bisindazolipiridina, y sus complejos. Estudiándose dentro de las dos familias de ligandos la influencia ejercida por el sustituyente en posición 4 de la piridina. Para ello se realizaron los espectros de absorción y de luminiscencia.

Estudio de espectrofotometría de absorción

Los espectros de absorción, tanto de los ligandos libres como de los complejos de Europio y Terbio, se realizaron en disoluciones acuosas a concentraciones 10^{-4} , 10^{-5} y $5 \cdot 10^{-6}$ M. En la Gráfica 4.1 se muestran los espectros de absorción de los ligandos libres. Se puede observar como la sustitución del anillo de pirazol por el anillo de indazol provoca un desplazamiento batocrómico de las bandas, que es debido a la mayor deslocalización electrónica aportada por los anillos de indazol. Los ligandos con grupos indazol presentan máximos de absorción en torno 330 nm. y extendiéndose hasta los 360 nm. aproximadamente, atribuyéndose a las transiciones $\pi-\pi^*$ de los anillos de indazol, mientras que en los ligandos bispirazólicos, estas transiciones se sitúan en torno a 315nm.



Gráfica 4.1 Espectros de absorción de los ligandos libres

Los complejos con lantánidos se prepararon utilizando cantidades equimoleculares del ligando libre y los cloruros de los lantánidos correspondientes. Como ya se ha discutido, estos ligandos están diseñados para saturar la esfera de coordinación del ion lantánido por lo que se utilizan las sales de los lantánidos en forma de cloruros, no haciéndose

necesario añadir ningún coligando o agente sinérgico como los éteres corona empleados en el estudio de la complejación con los aminoácidos del capítulo anterior.

Para que los grupos ácidos de los ligandos estén en forma de carboxilatos para asegurar así una compensación de carga y una coordinación efectiva con el ion lantánido, la complejación se realiza en una disolución de buffer borato 0.05M a pH básico (pH=8.1), siguiendo el método descrito por Jinly y cols. para este tipo de ligandos.¹²⁹

En la TABLA 4.8 y Tabla 4.9 se recogen los datos de los espectros de absorción para los ligandos libres y sus complejos de Europio y Terbio.

Ligando	Complejo	
	Eu	Tb
I-a		
λ (nm)	316.5	320
ϵ	10.4	11.3
I-b		
λ (nm)	307	317.5
ϵ	22.6	25.1
I-c		
λ (nm)	304	313.5
ϵ	32.7	34.5
I-d		
λ (nm)	298	305
ϵ	22.1	19.1

Tabla 4.8

Ligando	Complejo	
	Eu	Tb
II-a		
λ (nm)	324	323.5
ϵ	7.9	9.2
II-b		
λ (nm)	318	321
ϵ	24.4	25.1
II-c		
λ (nm)	326.5	335.5
ϵ	27.6	28.1
II-d		
λ (nm)	325	330
ϵ	17.7	20.4

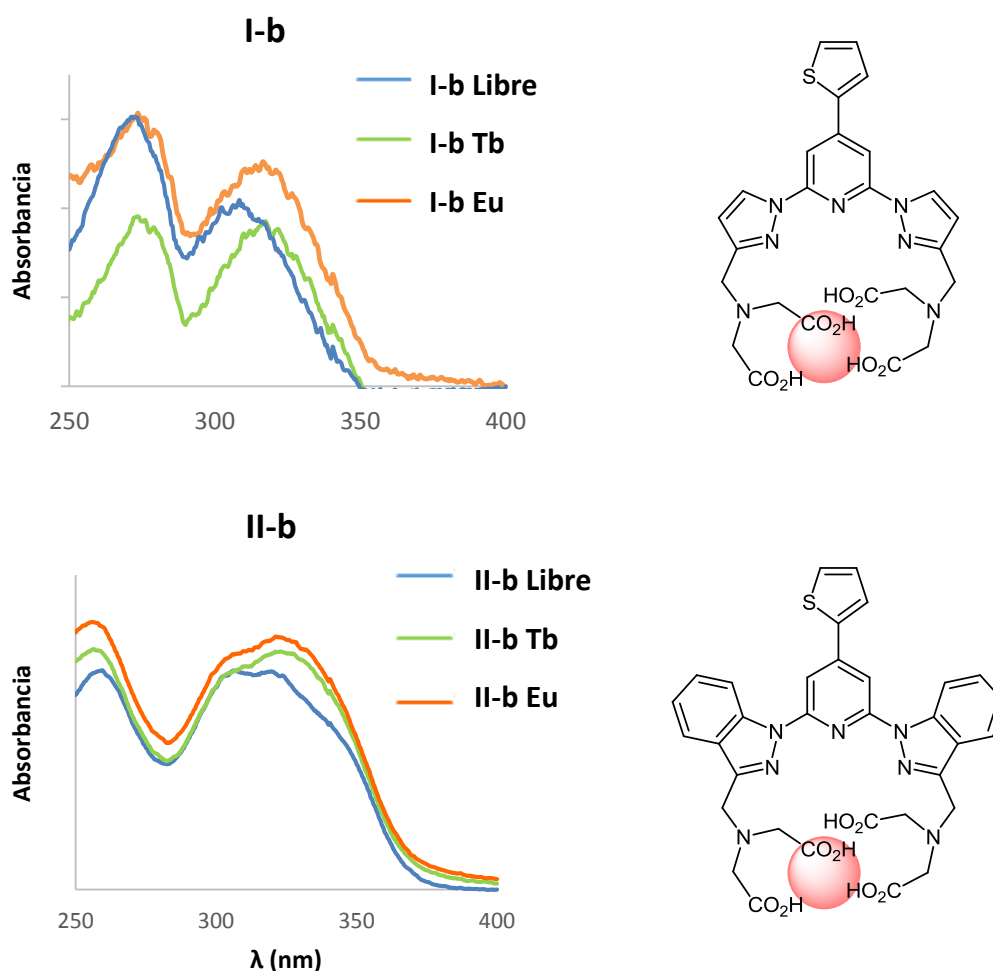
Tabla 4.9

Como se puede observar en la Tabla 4.8, en los derivados del 1-bpp se observa un desplazamiento batocrómico de los máximos de absorción al formarse los complejos. Esto es debido a que en la formación de los complejos los anillos de la unidad quelante han de adoptar una conformación diferente a la del ligando libre. De esta manera al formarse el complejo hay una reorientación de los anillos pirazólicos, que los fuerza a adoptar una mayor planaridad provocando el desplazamiento de las transiciones π - π^* centradas en la estructura bispirazolica responsable de la coordinación al metal, hacia energías más bajas.

¹²⁹ J. Yuan, G. Wang, K. Majima, K. Matsumoto. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 8.

Como se puede ver en la Tabla 4.9, para el caso de los ligandos derivados del *1-bip*, este efecto batocrómico es menos pronunciado. Esto indica que la coordinación del metal al ligando no modifica la estructura del ligando tanto como lo hacía en el caso de los derivados bispirazólicos o que en el caso de estos ligandos la posición relativa de los indazoles se aproxima más a la que presentan en el complejo. La mayor deslocalización electrónica de los anillos de indazol sería la causante de este efecto.

A modo de ejemplo se muestran en la Gráfica 4.2 los espectros de absorción de los ligandos libres **I-b** y **II-b** y sus correspondientes complejos de Europio y Terbio.



Gráfica 4.2 Espectros de absorción de los ligandos **I-b** y **II-b**, y sus complejos de Eu y Tb.

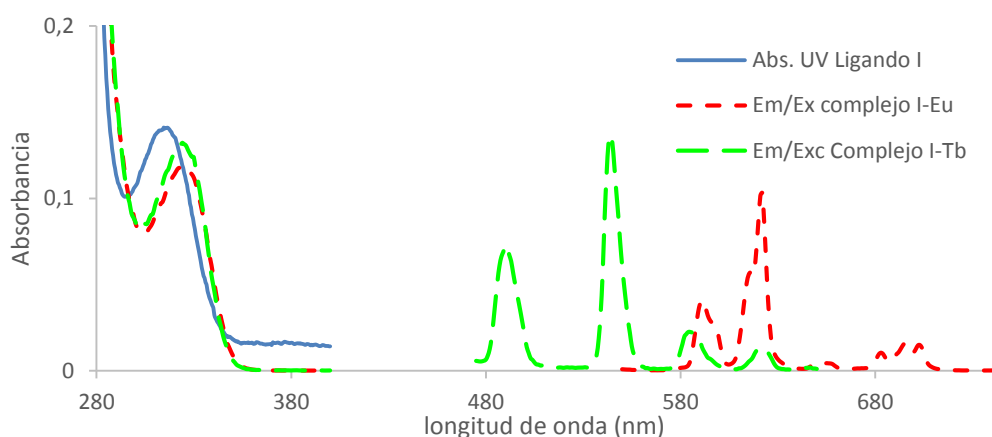
Otro dato que se puede observar, es que no existe un comportamiento diferenciado entre ambos iones al formar los complejos, este dato es el esperado, ya que los radios iónicos y las densidades de carga son similares (Tabla 4.10), lo que se traduce en espectros de absorción de los complejos muy similares.

	Eu ³⁺	Tb ³⁺
Diámetro iónico (Å)	2,24	2,19
Densidad de carga (q Å⁻¹)	2,68	2,74

Tabla 4.10

Estudio de espectrofotometría de emisión de los complejos de Eu y Tb

Se registraron los espectros de excitación/emisión de fosforescencia de los complejos de Europio y Terbio de los ligandos. En todos los casos los espectros de emisión fueron similares y los de excitación confirman que la naturaleza de la excitación concuerda con los espectros de absorción. La Gráfica 4.3 ilustra el resultado con el ligando bispirazólico I.



Gráfica 4.3 Espectro de Absorción del ligando **I-a** y espectros de excitación y emisión de sus complejos de Eu y Tb

La intensidad de la luminiscencia es un parámetro importante del que se obtiene el valor del rendimiento cuántico, según la Ecuación 1.8, presentada en la introducción. Los rendimientos cuánticos obtenidos para los complejos de Europio y Terbio se muestran en la Tabla 4.12 y Tabla 4.14. A la vista de los valores de rendimientos cuánticos, se puede decir que los ligandos, tanto bispirazólicos como bisindazólicos, sensibilizan de manera más efectiva al Terbio que al Europio, excepto en el caso del ligando **I-b**. Estos resultados obtenidos para el ligando **I-b** coinciden con los descritos en la bibliografía para este tipo de ligandos,¹³⁰ donde la presencia de un grupo tiofeno sobre la posición 4 de la piridina favorece la luminiscencia del complejo de Europio, lo que se traduce en un mayor valor de su rendimiento cuántico en detrimento del complejo de Terbio. Esto es debido a la baja energía de su nivel triplete (T_1), lo cual será discutido con mayor

¹³⁰ J. Yuan, M.Tan, G. Wang. *Journal of Luminescence*, **2004**, 106, 91.

profundidad cuando se presenten los resultados de las medidas de las energías de los estados triplete de los ligandos.

El ligando **I-a** muestra un excelente rendimiento cuántico para el complejo de Terbio, lo cual pone de manifiesto la gran efectividad en las transiciones electrónicas entre sus niveles energéticos S_1-T_1 y el cruce entre sistemas $T_1-^5D_6$ (Tb), en cambio para el Europio el rendimiento cuántico es de un 10%, esto se debe a la menor efectividad a la hora de transferir la energía como se mostrara más adelante, cuando se discutan los fenómenos de extinción. El ligando **I-c** muestra un comportamiento interesante al presentar valores de rendimiento similares para ambos iones. Otros autores describen sistemas similares en los que el sustituyente en posición 4 son también fenietinilos 4'-sustituídos,¹²⁷ pero en estos los complejos de Europio son notablemente mejores que los de Terbio, lo que constituye un prometedor resultado para este ligando que puede servir como sonda dual de ambos lantánidos con respuestas comparables.

El ligando **I-d** presenta buenos rendimientos cuánticos en sus complejos de Terbio, el grupo –OMe en posición para del fenilo, aumenta el los valores de absorptibilidad pero disminuye su rendimiento cuantico.

Ligando I	Eu ³⁺	Tb ³⁺
I-a		
ϕ	0.10	1.0
$\lambda_{exc.}$	317.5	315.5
I-b		
ϕ	0.02	0.008
$\lambda_{exc.}$	318.5	317.5
I-c		
ϕ	0.17	0.19
$\lambda_{exc.}$	306	302
I-d		
ϕ	0.09	0.62
$\lambda_{exc.}$	303.5	297

Tabla 4.11 Valores fotofísicos de los complejos de Eu y Tb de los ligandos derivados de 1-bpp

Ligando II	Eu ³⁺	Tb ³⁺
II-a		
ϕ	0.01	0.24
$\lambda_{exc.}$	322.5	325.5
II-b		
ϕ	0.001	0.006
$\lambda_{exc.}$	322.5	323
II-c		
ϕ	0.04	0.32
$\lambda_{exc.}$	322.5	324.5
II-d		
ϕ	0.009	0.03
$\lambda_{exc.}$	330	330.5

Tabla 4.12 Valores fotofísicos de los complejos de Eu y Tb de los ligandos derivados de 1-bip

En cuanto a los rendimientos cuánticos para los complejos de los ligandos derivados de 1-bip son menores que los observados en sus análogos con el esqueleto de 1-bpp,

excepto en el caso del complejo de Terbio con el ligando **II-c** que tiene un fenilacetileno como sustituyente y que presenta el tercer mejor rendimiento cuántico para este ion de toda la serie.

Estas bajas intensidades de fosforescencia son debidas a la pérdida de energía en fenómenos de desexcitación, lo cual muestra la poca eficacia en la transferencia de energía que presentan los ligandos derivados de bisindazolilpiridina.

Los tiempos de vida de los complejos de Europio están comprendidos en torno a 1.3 ms. Análogamente, los tiempos de vida de los complejos de Terbio son también bastante altos, y están comprendidos entre 1.6-2.7 ms. Estos resultados son coherentes con los descritos en la bibliografía para complejos semejantes, en los que los complejos de Terbio muestran mayores valores que los complejos de Europio. Estos valores ponen de manifiesto el excelente aislamiento del metal frente al medio, siendo los restos ácidos de las unidades de iminodiacético, así como los átomos de nitrógeno dadores del cromóforo los responsables de la saturación la esfera de coordinación del metal (Tabla 4.13).

Ligando I	τ (ms)	Eu ³⁺	Tb ³⁺	Ligando II	τ (ms)	Eu ³⁺	Tb ³⁺
I-a	τ_{H_2O}	1.35	2.68	II-a	τ_{H_2O}	1.41	1.01
	τ_{D_2O}	2.63	2.92		τ_{D_2O}	2.03	1.48
I-b	τ_{H_2O}	1.32	1.93	II-b	τ_{H_2O}	0.80	1.52
	τ_{D_2O}	2.31	2.31		τ_{D_2O}	1.64	1.87
I-c	τ_{H_2O}	1.35	2.43	II-c	τ_{H_2O}	1.16	1.02
	τ_{D_2O}	2.19	2.59		τ_{D_2O}	1.93	1.47
I-d	τ_{H_2O}	1.38	1.66	II-d	τ_{H_2O}	1.38	1.44
	τ_{D_2O}	2.26	2.29		τ_{D_2O}	1.81	1.86

Tabla 4.13 Tiempos de vida registrados en H₂O y D₂O de los complejos de Europio y Terbio de los ligandos **I (a-d)** y **II (a-d)**.

Las medidas de tiempo de vida en agua deuterada (D₂O), permiten calcular el número de hidratación, mediante el método propuesto por Horrock (Ecuación 1.9), usando los coeficientes de Bebbby (Tabla 4.14).¹³¹

¹³¹ A. Beeby, I. M. Clarkson, R. Dickins, S. Faulkner, D.Parker, L.Royle,; A. S. de Sousa, J. A. G. Williams, M.Woods, *J. Chem. Soc.,Perkin Trans. 2* **1999**, 493.

Ligando	q Tb	q Eu
I-a	0.15	0.13
I-b	0.13	0.08
I-c	0.12	0.04
I-d	0.52	0.33
II-a	1.28	0.26
II-b	0.30	0.47
II-c	1.18	0.11
II-d	0.77	0.33

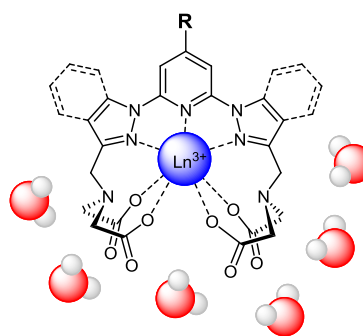


Figura 4.6

Tabla 4.14 Moléculas de H₂O coordinadas al ion lantánido

Los valores registrados en la Tabla 4.14 indican, en casi todos los casos, la ausencia de moléculas de agua en la primera esfera de coordinación, en concordancia con la protección que ejerce el ligando nonadentado al metal, tal y como se había observado por nosotros en los primeros ligandos de este tipo sintetizados. Cabe señalar los casos de los complejos de Terbio de los ligandos **II-a** y **II-c** que presentan valores discrepantes por encima de la unidad, esto puede deberse a la presencia de una molécula de agua que establezca un enlace de hidrogeno con uno de los grupos carbonilos y que provoque un acercamiento al metal sin llegar a formar un enlace con él, situándose en lo que a menudo se denomina como segunda esfera de coordinación del lantánido,¹³² aunque no queda clara la razón por la que los sustituyentes fenilo y fenietileno puedan mostrar este comportamiento para solamente los ligandos bisindazólicos, máxime cuando los valores de rendimiento cuántico para estos dos ligandos son superiores a los otros dos miembros de esta serie de ligandos bisindazólicos. Estos resultados muestran repetitividad en distintas determinaciones no habiendo encontrado razones para este comportamiento.

Tal y como se describió en la introducción y se llevó a cabo para los complejos en el capítulo 3, los niveles de energía del estado triplete se determinan a partir de los complejos de los ligandos orgánicos con el ion Gd, registrando su espectro de emisión de fosforescencia a 77K.

Los niveles de energía del estado triplete para los complejos de Gadolinio de los ligandos tetracarboxílicos se muestran en la Tabla 4.15 Energías de los estados tripletes

¹³² S. Aime, M. Botta, D. Parker, J.A. Gareth Williams. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1996**, 17.

Ligando	λ (nm)	Energía
I-a	428	23364
I-b	472	21161
I-c	426	23474
I-d	462	21881
II-a	473	21142
II-b	445	22474
II-c	460	21739
II-d	485	20618

Tabla 4.15 Energías de los estados tripletes

Además se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de los ligandos libres. De esta manera se obtienen los datos las energías de los estados singlete de los ligandos (Tabla 4.16).

Ligando	λ (nm)	Energía
I-a	367	27238
I-b	366	27315
I-c	370	27020
I-d	378	26415
II-a	392	25523
II-b	388	25741
II-c	399	25037
II-d	388	25785

Tabla 4.16 Energías del estados singletes

Puede observarse que si bien la energía del estado triplete no tiene una dependencia clara de la estructura, en el caso de las energías de los estados singlete de los ligandos se observa la diferencia según el anillo aromático que presenten. Los derivados bispirazólicos tienen en todos los casos una mayor energía que en el caso de los ligandos bisindazólicos.

La relación entre las energías del estado singlete (S_1) y estado triplete (T_1) fue estudiada por Reinhoudt y cols.,¹³³ que establecieron que el proceso de cruce entre sistemas $^1\pi\pi^*$ - $^3\pi\pi^*$ es efectivo cuando la diferencia energética, ΔE , es por lo menos de 5000cm^{-1} , para todo tipo de ligandos. Esta diferencia energética, proponen, evita la transferencia de

¹³³ F.J. Steemers, W. Verboom. D.N. Reinhoudt, E.B. Vander Tol, J.W. Verhoeven. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9408.

energía desde el estado singlete del ligando a los niveles emisivos del lantánido $^1\pi\pi^*$ - 5D_j .

Sin embargo, Malta y cols.¹³⁴ comprobaron mediante modelos teóricos que la transferencia de energía del estado singlete al lantánido es mínima, pese a que la ΔE S_1 - T_1 del ligando sea menos de 5000 cm^{-1} . En nuestro caso, la diferencia energética entre ambos estados excitados es en todos los casos menor de 5000 cm^{-1} , sin embargo, al observarse el rendimiento cuántico del ligando **I-a** que está muy próximo a la unidad, corrobora la teoría que la transferencia singlete-metal es despreciable.

Al ser la energía de los niveles triplete el máximo responsable de los procesos de transferencia de energía al lantánido, estos han de cumplir ciertos requisitos. Así, para asegurar una transferencia energética efectiva y evitar una restrotransferencia de energía entre el estado excitado del metal al estado triplete del ligando (Figura 4.7),¹³⁵ que disminuiría el valor del rendimiento cuántico como se ha observado en el complejo de Terbio con el ligando **I-b** la diferencia energética entre el estado triplete del ligando y el estado excitado del lantánido ha de estar situado en torno a 2000 cm^{-1} para el caso de los complejos de Terbio y 2500 cm^{-1} para el caso de los complejos de Europio.

La pequeña diferencia de energía que hay entre el estado triplete ($^3\pi\pi^*$) de los ligandos **II-a** y **II-c** y el nivel 5D_4 del Terbio, lo que produce una retrotransferencia de energía de origen térmico al estado triplete, y es la responsable de que los valores de tiempo de vida de sus complejos de Europio sean mayores que los de sus complejos de Terbio (Figura 4.7).

¹³⁴ G.F. De Sa, O.L. Malta, C.D. Donega, A.M. Simas, R.L. Longo, P.A. Santa-Cruz. E.F. Da Silva. *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 196, 165.

¹³⁵ T.J. Sørensen, A.M. Kenwright, S. Faulkaner. *Chem. Sci.*, **2015**, 6, 2054

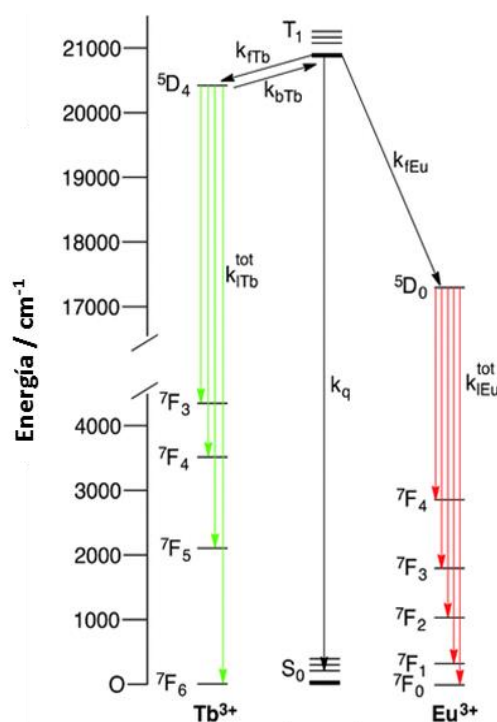


Figura 4.7

Los iones de Europio y Terbio son capaces de aceptar energía en todos sus niveles excitados, 5D_j , aunque el rendimiento cuántico será más alto cuando la energía se transfiera de forma efectiva y directa desde el estado triplete del ligando a los estados excitados de menor energía del metal, que corresponden a los niveles 5D_0 para el Europio y 5D_4 para el Terbio, que presentan energías de 17250 cm^{-1} y 20500 cm^{-1} , respectivamente (Figura 4.8).

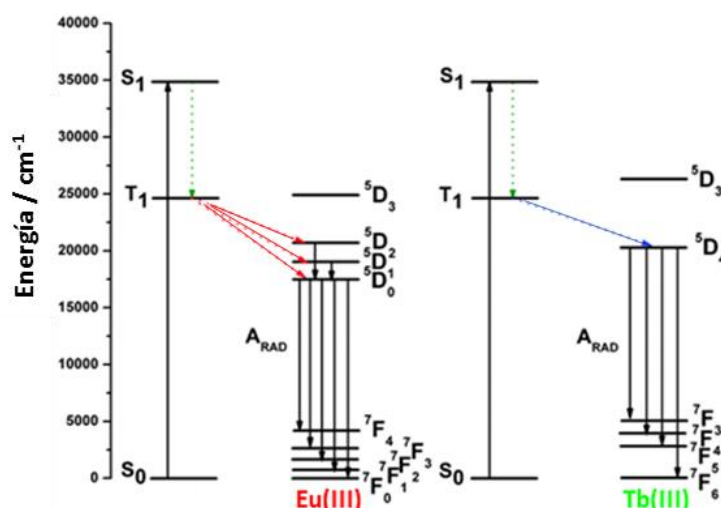


Figura 4.8

Como puede verse en la Tabla 4.17, la diferencia energética entre el estado triplete de los ligandos derivados de 1-bpp y 1-bip y el 5D_0 del Europio, está por encima del intervalo

estimado para obtener buenos resultados de emisión, lo que justifica los datos obtenidos.

Ligando I	ΔE Eu (cm^{-1})	ΔE Tb (cm^{-1})	Ligando II	ΔE Eu (cm^{-1})	ΔE Tb (cm^{-1})
I-a	6114.5	2864.5	II-a	3891.6	741.6
I-b	2710.5	661.3	II-b	5221.9	1971.9
I-c	6224.2	2974.2	II-c	4789.1	1539.1
I-d	4621.0	1617.8	II-d	3368.5	776.6

Tabla 4.17 Diferencia energética entre el nivel triplete de los ligandos y nivel emisor 5D_0 del Europio y 5D_4 del Terbio.

En el caso de los ligandos bispirazólicos para sus complejos de Terbio, los valores de diferencia energética entre el estado triplete y el 5D_4 del Terbio obtenidos para los ligandos **I-a**, **I-b** y **I-c** están cerca de los valores óptimos para obtener un buen resultado de rendimiento cuántico, mientras que el ligando **I-b** tiene un valor demasiado bajo, lo que justifica el bajo valor de rendimiento cuántico obtenido ya que existe una retrotransferencia de energía Tb-Ligando.

En cuanto a los complejos de Terbio de los ligandos bisindazólicos, son los ligandos **II-b** y **II-c** son aquellos que presentan los valores de diferencia energética cercanos a los óptimos.

Los complejos de Europio de los ligandos derivados de 1-bip, pese a estar en el intervalo estimado para obtener un buen resultado de emisión, presentan menos rendimientos cuánticos que los derivados de 1-bpp, esto es debido a que la desexcitación del estado emisor del ion lantánido está gobernada por diferentes procesos radiantes y no radiantes, estos últimos pueden llegar a extinguir la luminiscencia.

Fenómenos de extinción

La pérdida de energía por parte del ion lantánido está gobernada por procesos de desexcitación radiativos y no radiativos, siendo en general estos últimos los más importantes. El cálculo de los tiempos de vida en H_2O y D_2O a temperatura ambiente y a baja temperatura permite conocer el número de moléculas de agua en la primera esfera de coordinación del metal, principal fuente de desexcitación no radiativa en el proceso global, pero también cuantificar como afectan otros procesos de desexcitación no radiativa a la extinción de la luminiscencia.

En la Tabla 4.18 y la Tabla 4.19 se aprecia el aumento de los tiempos de vida al cambiar el H_2O por D_2O como disolvente, lo que indica la sensibilidad de los complejos a ser

desexcitados por acoplamiento vibracional O-H de las moléculas de agua entorno al lantánido. En todos los casos se observa como los tiempos de vida aumentan para los complejos de Eu y Tb como consecuencia de la neutralización de este proceso de desexcitación y como en los complejos de Eu esta vía de desexcitación pesa más que en los de Tb ya que los tiempos de vida de ambos lantánidos tienden a igualarse en D₂O.

El registro de las medidas en D₂O a baja temperatura (77K) permite determinar el tiempo de vida radiante, τ_r , al minimizar los procesos no radiantes, debidos a la temperatura.

	Eu	Tb
I-a		
$\tau_{(D_2O)}$	2.63	2.92
$\tau_{(H_2O)}$	1.35	2.68
$\tau_{(D_2O, 77K)}$	3.77	3.68
q	0.43	0.15
I-b		
$\tau_{(D_2O)}$	2.31	2.31
$\tau_{(H_2O)}$	1.32	1.93
$\tau_{(D_2O, 77K)}$	2.66	2.31
q	0.39	0.43
I-c		
$\tau_{(D_2O)}$	2.19	2.59
$\tau_{(H_2O)}$	1.35	2.43
$\tau_{(D_2O, 77K)}$	2.29	2.88
q	0.34	0.12
I-d		
$\tau_{(D_2O)}$	2.26	2.29
$\tau_{(H_2O)}$	1.38	1.66
$\tau_{(D_2O, 77K)}$	2.52	3.22
q	0.34	0.83

Tabla 4.18

	Eu	Tb
II-a		
$\tau_{(D_2O)}$	2.03	1.48
$\tau_{(H_2O)}$	1.41	1.01
$\tau_{(D_2O, 77K)}$	2.36	2.82
q	0.26	1.58
II-b		
$\tau_{(D_2O)}$	1.64	1.87
$\tau_{(H_2O)}$	0.80	1.52
$\tau_{(D_2O, 77K)}$	1.99	2.75
q	0.77	0.61
II-c		
$\tau_{(D_2O)}$	1.93	1.47
$\tau_{(H_2O)}$	1.16	1.02
$\tau_{(D_2O, 77K)}$	2.21	2.74
q	0.41	1.49
II-d		
$\tau_{(D_2O)}$	1.81	1.86
$\tau_{(H_2O)}$	1.38	1.45
$\tau_{(D_2O, 77K)}$	1.95	1.87
q	0.33	0.77

Tabla 4.19

La determinación del tiempo de vida radiante de los complejos, permite la obtención de otros parámetros de extinción (Tabla 4.20), como la constante de desexcitación lumínica k_r . ($\tau_r = k_r^{-1}$ Ecuación 1.5).

	I-a	I-b	I-c	I-d	II-a	II-b	II-c	II-d
$K_r Tb$	0.27	0.43	0.35	0.31	0.35	0.36	0.36	0.53
$K_r Eu$	0.26	0.37	0.43	0.40	0.42	0.50	0.45	0.51
$K_{nr(T)} Tb$	0.07	0.001	0.04	0.12	0.31	0.17	0.31	0.002
$K_{nr(T)} Eu$	0.11	0.05	0.02	0.04	0.06	0.10	0.06	0.04
$K_{nr(OH)} Tb$	0.03	0.08	0.02	0.16	0.32	0.12	0.30	0.15
$K_{nr(OH)} Eu$	0.36	0.32	0.28	0.28	0.21	0.64	0.34	0.17
$K_{obs} Tb_{H_2O}$	0.37	0.52	0.41	0.60	0.99	0.66	0.98	0.69
$K_{obs} Eu_{H_2O}$	0.74	0.75	0.74	0.72	0.71	1.25	0.86	0.72

Tabla 4.20 Constantes de desexcitación.

Se puede observar que la constante de desexcitación lumínica (k_r) tiene valores similares para todos los complejos estudiados, tanto para Europio como para Terbio. En cuanto a los valores de la constante de desexcitación no radiativa en función de la temperatura ($k_{nr(T)}$) se puede observar que aquellos ligandos con energías del nivel triplete próximas a la energía del estado emisor del Terbio presentan mayores valores que sus complejos de Europio. Esto pone de relieve la retrotransferencia de origen térmico que se produce desde el nivel 5D_4 del Terbio al estado triplete del ligando orgánico.

Respecto a la constante de desexcitación no radiativa por acoplamiento con los niveles vibracionales del enlace O-H ($K_{nr(OH)}$), los valores de los complejos de Terbio presentan valores bajos a excepción de los ligandos V y VII, los cuales eran precisamente los que tenían mayores valores de moléculas de solvatación sobre el lantánido.

En cuanto a los valores obtenidos para los complejos de Eu son en casi todos los casos mayores que los de los complejos de Tb, debido que el Europio se ve más afectado por la desexcitación por el acoplamiento de los niveles vibracionales del enlace O-H.

Los valores de las constantes de desactivación observadas ponen de manifiesto que en los complejos de Tb la pérdida de energía se produce mayoritariamente por transiciones radiativas, siendo el porcentaje 65-90% en el caso de los derivados de *bpp* y del 50-70% en el caso de los derivados de *bip*. Por el contrario en los complejos de Europio la pérdida de energía está gobernada principalmente por transiciones no radiativas.

Por último en la Tabla 4.21 se muestran los valores calculados de la eficacia en la absorción de energía por el ligando y su transferencia al metal ($\eta_{en.tr}$) y la eficacia de la emisión de luminiscencia del metal (ϕ_M), estos valores han sido calculados mediante las ecuaciones 1.2 y 1.4.

	I-a	I-b	I-c	I-d	II-a	II-b	II-c	II-d
$\phi_M Tb_{H_2O}$ (%)	95	83	84	78	48	55	43	77
$\eta_{en.tr} Tb$ (%)	100	3	23	97	67	78	39	5
ϕ_{L-Tb} (%)	100	2	19	62	24	0.6	32	3
$\phi_M Eu_{H_2O}$ (%)	37	50	59	55	60	40	52	70
$\eta_{en.tr} Eu$ (%)	28	20	29	10	2	0.2	7	0.1
ϕ_{L-Eu} (%)	11	8	17	9	1	0.1	4	1

Tabla 4.21 Eficacia en la transferencia de energía.

Para todos los ligandos estudiados, a excepción del ligando **I-b**, los valores de $\eta_{en.tr}$ para los complejos de Terbio son mayores que los complejos de Europio. La mayor transferencia de energía se debe a la mayor concordancia entre los niveles energéticos del estado triplete del ligando con los niveles emisivos del Terbio.

En el caso del ligando **I-b** como se ha comentado anteriormente, la retrotransferencia de energía desde el metal al ligando, es uno de los procesos responsables de sus bajos valores.

Los valores de ϕ_M para todos los complejos de Europio son, en general, inferiores a los de Terbio, estos valores son debidos a que el ion de Europio se ve más afectado, como se ha discutido, por diferentes procesos de desexcitación radiativos que para el caso del Terbio, en los que sus mayores valores reflejan, además, la más eficaz transferencia de energía y hacen de este tipo de ligandos los que mayores rendimientos cuánticos presentan.

Los ligandos **II-a** y **II-c** presentan unos valores anómalos que son consecuencia del alto valor de moléculas de agua en la segunda esfera de coordinación del Terbio (>1).

Tras el estudio fotofísico de los ligandos preparados y sus complejos, se puede concluir que los ligandos derivados de la estructura de 1-bpp son los que mejores propiedades tienen para este tipo de ensayos, y que pese a las expectativas generadas por la introducción de unidades que aportan mayor conjugación a la estructura, como los anillos de indazol, estos no mejoran las propiedades luminiscentes de los complejos como esperábamos.

Además los resultados obtenidos para los complejos del ligando **I-c** resultan prometedores a la hora de abordar la síntesis de nuevas sondas duales, ya que presenta un comportamiento de forma similar para ambos iones.

5. Diseño y estudio de nuevos materiales moleculares luminiscentes.

Basándonos en la experiencia adquirida a lo largo de este trabajo en la síntesis de ligandos poliheterocíclicos y apreciando la gran variedad de estructuras que pueden prepararse a partir de la 2,4,6-trifluoropiridina y 4-bromo-2,6-difluoropiridina, se recogen las estructuras de la Figura 5.1 como posibles candidatos fácilmente accesibles sobre la base de la metodología sintética puesta a punto y que podrían servir como elementos estructurales para el acceso a materiales metalo orgánicos (MOFs) y para el caso de los iones lantánidos para MOFs luminiscentes.

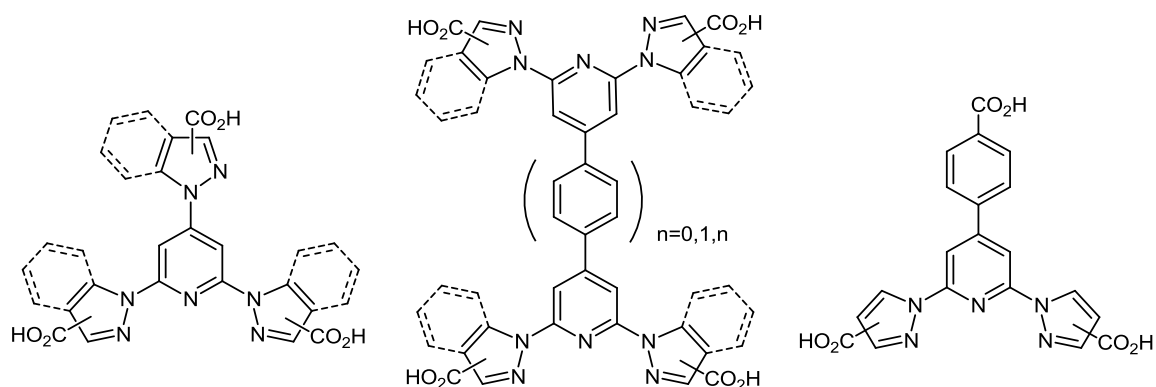


Figura 5.1

Este capítulo tiene, por consiguiente, como objetivo principal la ampliación de la metodología sintética, desarrollada para el acceso a las antenas sensibilizadores de iones lantánidos, a la síntesis de estas unidades estructurales y algún estudio preliminar de las propiedades de algunos de estos compuestos.

Un MOF es un material híbrido, obtenido a partir de la unión de un ion metálico y un ligando orgánico multifuncional (Figura 1), que se ordenan gobernados por fuerzas intermoleculares, como puentes de hidrogeno, interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals, entre otras. Por lo tanto, la elección del ion metálico y los ligando orgánicos utilizados en la síntesis tienen efectos significativos sobre la estructura y las propiedades del producto final. Tradicionalmente se han venido utilizando como ligandos estructuras como las representadas en la figura 1.1.

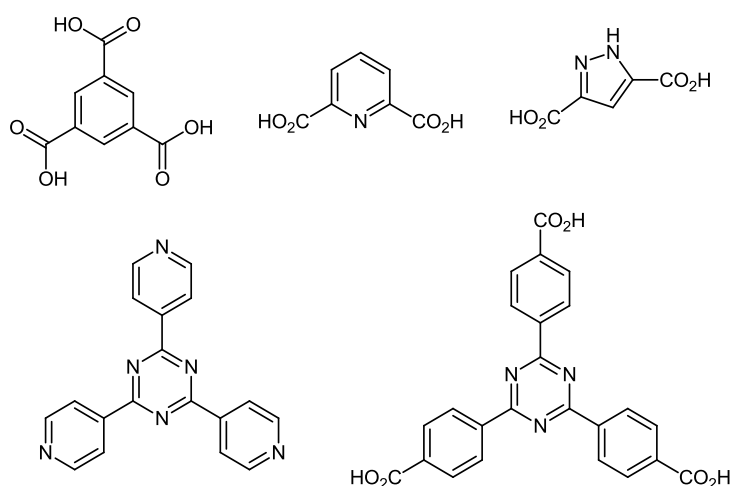


Figura 5.2

Para la preparación de MOF's luminiscente las estructuras han de poder coordinarse al metal que origina el material formando una estructura supramolecular, pero dejando puntos de coordinación libres y tener cromóforos capaces de absorber la luz y para poder complejar sensibilizar el ion lantánido mediante el efecto antena (Figura 5.3)

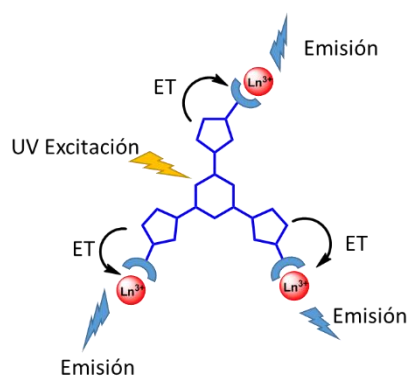


Figura 5.3

Siguiendo estas premisas y a la vista de las buenas propiedades quelantes y sensibilizadoras de iones lantánidos de los derivados de bispirazolilpiridina y bisindazolilpiridina se decidió modificar este tipo de estructuras para ser utilizadas como unidades estructurales en la síntesis de nuevos materiales híbridos luminiscentes.

5.1. Síntesis de unidades estructurales

Así pues, y a la vista de la reactividad mostrada por las posiciones fluoradas y bromada sobre el anillo de piridina, en la Figura 5.2 se muestran las estructuras inicialmente propuestas para su síntesis. El criterio para esta elección ha sido el de su fácil acceso y buenos rendimientos de las etapas de síntesis. Al tratarse de estructuras cuya aplicación es su empleo como materiales, la cantidad de necesaria de estas unidades estructurales es grande por lo que sus síntesis han de transcurrir en pocas etapas y con buenos rendimientos.

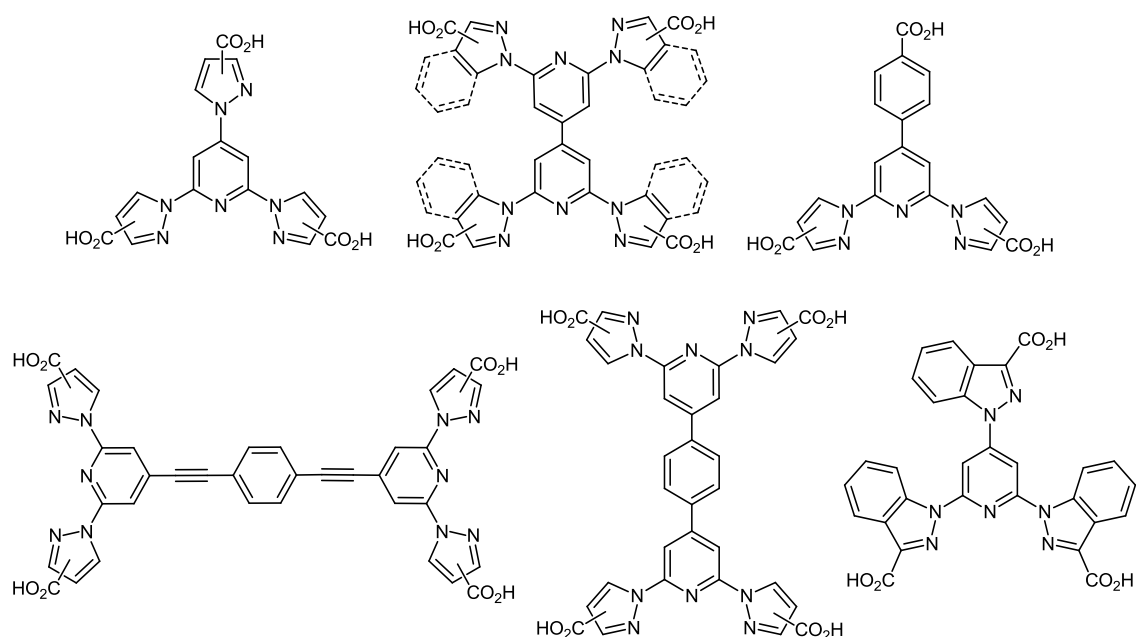
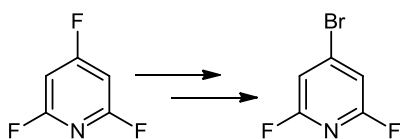


Figura 5.4

Además de las estructuras abordables a partir de la 4-bromo-2,6-difluoropiridina mediante sustitución nucleófila y reacciones de acoplamiento, en la figura aparecen otras estructuras que son accesibles directamente a partir de la 2,4,6-trifluoropiridina. Esto supone una ventaja desde un punto sintético y económico, ya que aunque la 4-bromo-2,6-difluoropiridina se sintetiza a partir de la 2,4,6-trifluoropiridina, requiere dos etapas de síntesis con un rendimiento global del 38% (Esquema 5.1).



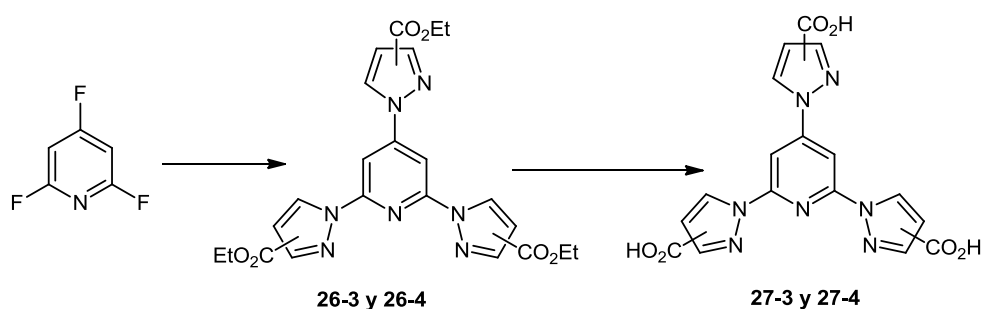
Esquema 5.1

Pese a la diversidad funcional y estructural de las unidades para la síntesis MOF's, las estructuras propuestas tienen en común que son ligandos polifuncionales aromáticos que pueden extenderse en el espacio formando estructuras supramoleculares, donde la fuerza dominante es la coordinación metal-ligando. La fortaleza de esta coordinación ha de dar como resultado un material rígido y estable. Además los anillos aromáticos de la estructura pueden estar conectados entre sí mediante fuerzas electroestáticas, enlaces de hidrógeno o por apilamiento π - π , las cuales en las síntesis de MOF's luminiscentes tienen una importante influencia, ya que la orientación, conjugación y distancia entre anillos aromáticos condicionan la estructura y al mismo tiempo pueden variar los niveles electrónicos de los cromóforos y así modificar sus espectros de emisión con, por ejemplo, un efecto batocrómico, respecto al complejo lantánido ligando en disolución, originando nuevas características de luminiscencia a los materiales preparados.

A sabiendas del carácter oxigenófilo de los lantánidos y de la importancia de los enlaces de hidrogeno para la formación de este tipo de macro-estructuras, todos los ligandos propuestos presentan varios grupos carboxilo en sus estructuras.

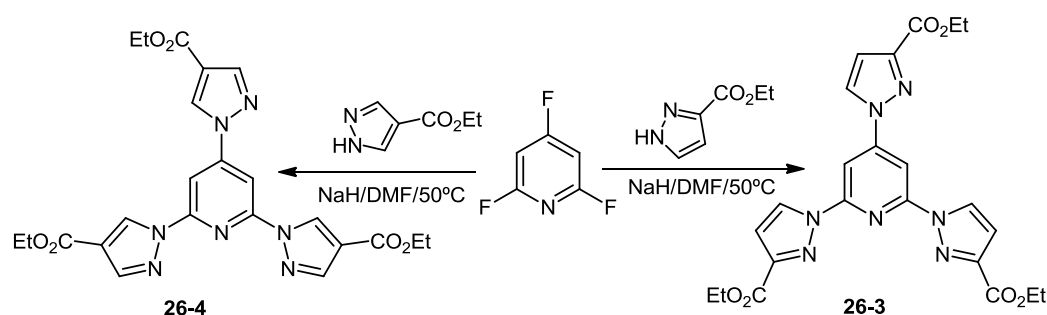
5.1.1. Preparación de los precursores derivados de 2,4,6-trispirazolilpiridina (1-*tpp*) y 2,4,6-trisindazolilpiridina (1-*tip*).

A partir de la 2,4,6-trifluoropiridina se sintetizan los derivados trisustituídos con el 3- y 4-etoxicarbonilpirazol, según el Esquema X.



Esquema 5.2

El primer paso consiste en la reacción de un equivalente de 2,4,6-trifluoropiridina con 3 equivalentes del 3-, 4-etoxicarbonilpirazolato sódico correspondiente, tal y como muestra el Esquema 5.3. La trisustitución se completa tras 12 horas a una temperatura de 50°C utilizando DMF como disolvente. Estas condiciones son más enérgicas que las requeridas para síntesis de los derivados disustituídos.

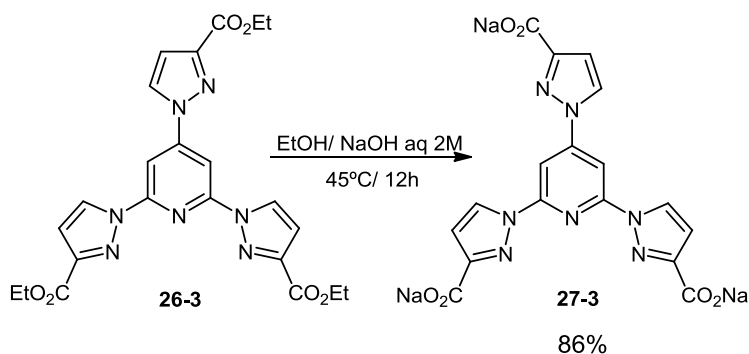


Esquema 5.3

Al igual que en todas las reacciones estudiadas en las que se introduce el 3-etoxicarbonilpirazol, solamente se obtiene el producto resultante de la tautomería 1,3 del pirazol, dando lugar a un único regioisómero de los 6 posibles. Su espectro de ¹H-RMN muestra dos tipos de pirazol en una relación 2:1 como consecuencia del distinto entorno químico del pirazol sobre la posición 4, las constantes de acoplamiento observadas son compatibles con la regioquímica 1,3 sobre ambos tipos de pirazol.

En el caso de la sustitución con 4-etoxicarbonilpirazol, ambos tautómeros son idénticos ya que el pirazolato presenta un eje de simetría C₂, lo que conduce a un único regioisómero posible. De nuevo los espectros muestran señales para dos pirazoles en entornos diferente de la piridina, posición 4 y posiciones 2 y 6.

La hidrólisis de los grupos éster de los ligandos **26-3** y **26-4**, utilizando las condiciones habituales, solución hidroetanólica de NaOH, da lugar a las sales sódicas de los ligandos triácidos.



Esquema 5.4

En la neutralización del medio básico de reacción, para la obtención de las unidades estructurales triácido para la preparación de los MOFs, se observa la formación de geles, los cuales bajo la luz ultravioleta a 254nm son fuertemente fluorescentes. La Imagen 2 muestra el gel correspondiente al ligando **27-4**. La aparición de estos geles en fase acuosa, de forma inesperada constituye un nuevo reto por su caracterización y estudio, el cual se abordará y discutirá mas adelante con los estudios preliminares llevados a cabo.



Imagen 2

La aparición de geles orgánicos constituye un interesante campo de investigación debido a su rareza y por sus posibles aplicaciones. Por esta razón se propuso abordar también la síntesis del ligando **28**, el cual presenta dos unidades de 4-etoxicarbonilpirazol en posiciones 2,6 y una de 3-etoxicarbonilpirazol en posición 4 de la piridina.

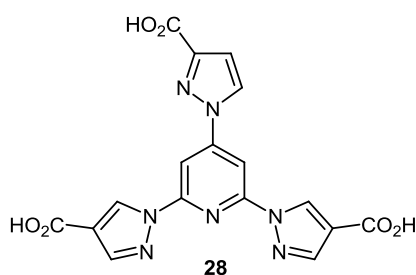
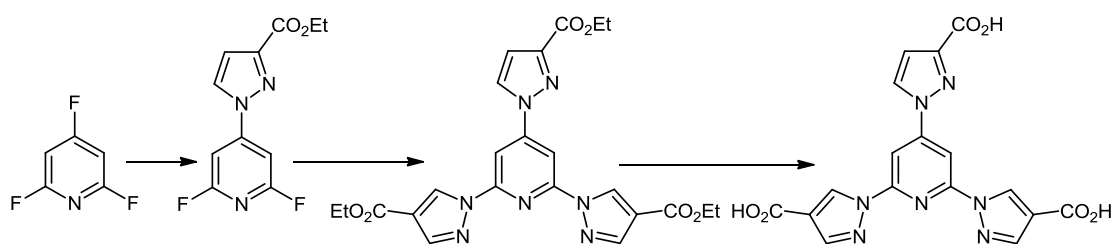


Figura 5.5 4-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-2,6-bis(4-etoxicarbonil-1-pirazolil)piridina

La ruta propuesta para la síntesis de este ligando (**28**), análogo estructural de los ligandos **27-3** y **27-4**, se recoge en el Esquema 5.5.

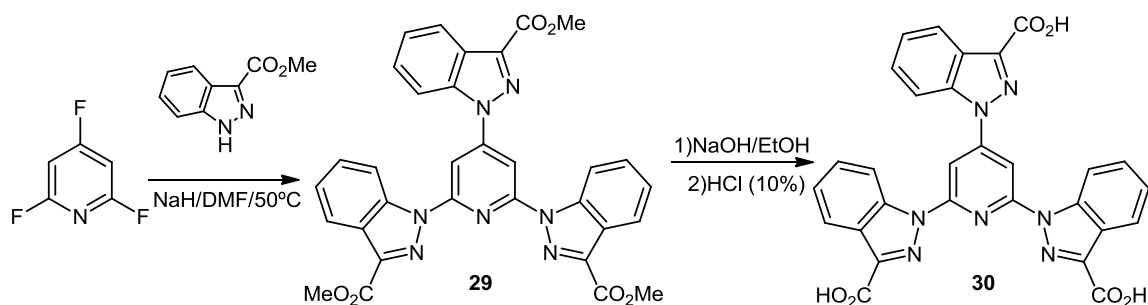


Esquema 5.5

En un primer paso se lleva a cabo una sustitución estereoselectiva del flúor en posición 4 de la piridina por un anillo de 3-etoxicarbonilpirazol. En contraste con los resultados obtenidos por Schlosser donde la sustitución del flúor de la posición 4 de la piridina, por hidracina o etóxido sódico conduce con elevada estereoselectividad y buenos rendimientos al producto 4-sustituido de forma muy selectiva, la reacción con el 3-etoxicarbonilpirazolato sódico no es tan regioselectiva, obteniéndose mezclas de productos polisustituídos.

Otra de las unidades estructurales propuestas que puede prepararse a partir de la 2,4,6-trifluoropiridina es el ácido 2,4,6-tris(3-carboxil-1-indazolil)piridina. La incorporación de los anillos de indazol proporcionan una extensión de la conjugación y más planaridad entorno a estos anillos, lo cual puede contribuir a un mayor apilamiento π - π sobre estas subestructuras, lo que favorecería la formación de materiales híbridos de distinta geometría y/o naturaleza.

Siguiendo el Esquema 5.6 el precursor **29** se sintetiza utilizando las mismas condiciones empleadas para la síntesis de piridinas tripirazolil sustituidas **26**.



Esquema 5.6

La sustitución nucleófila de los tres átomos flúor por los anillos de indazol permite obtener el producto **29** con un rendimiento de 66%. En el espectro de ^1H -RMN, Figura 5.6, de este ligando se puede observar el apantallamiento en la señal del protón de la posición 8 del anillo de indazol situado en posición 4 de la piridina, a un desplazamiento de 8.14 ppm, respecto a los situados en las posiciones 2 y 6 de la piridina, que aparecen a un desplazamiento de 8.71 ppm.

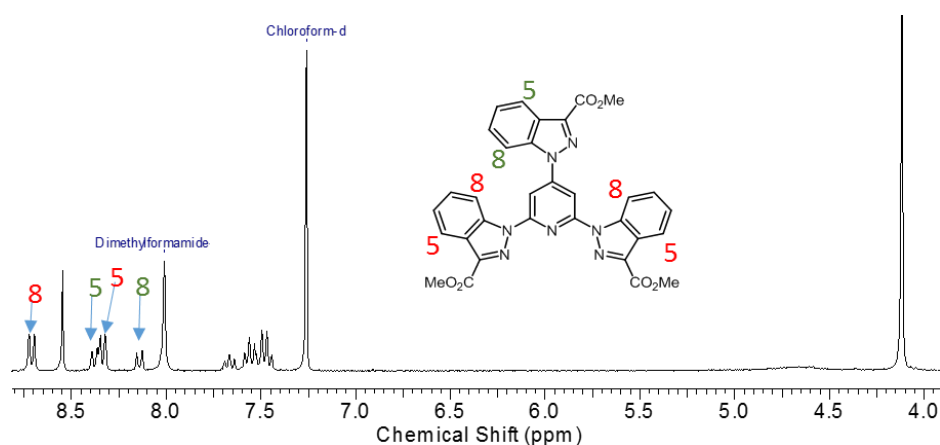


Figura 5.6

La saponificación, utilizando las condiciones generales establecidas para este tipo de reacción, y la neutralización de la fase acuosa da lugar al producto **30**, en forma de sólido blanco. En este caso no se ha observado la formación de geles, al menos en el medio acuoso donde han aparecido los primeros geles y en el que se han centrados los estudios preliminares llevados a cabo.

5.1.2. Preparación de los precursores derivados de 1-bpp y 1-bpp

Como se ha descrito hasta aquí, la versatilidad que ofrece la 4-bromo-2,6-difloropiridina como producto de partida, resulta extraordinaria ya que permite la ortogonalización de la síntesis con diferentes reacciones sobre cada posición de la piridina. La selectividad que ofrece a la hora de poder ser sustituida por diferentes grupos abre un amplio catálogo de estructuras con muy variadas aplicaciones. Siguiendo en la explotación de estas características para la síntesis de diferentes unidades estructurales, para el acceso a MOFs, se han propuesto diferentes aproximaciones que cumplen los requisitos sintéticos necesarios partiendo de la 4-bromo-2,6-difloropiridina, tal y como se recoge en la Figura 5.7.

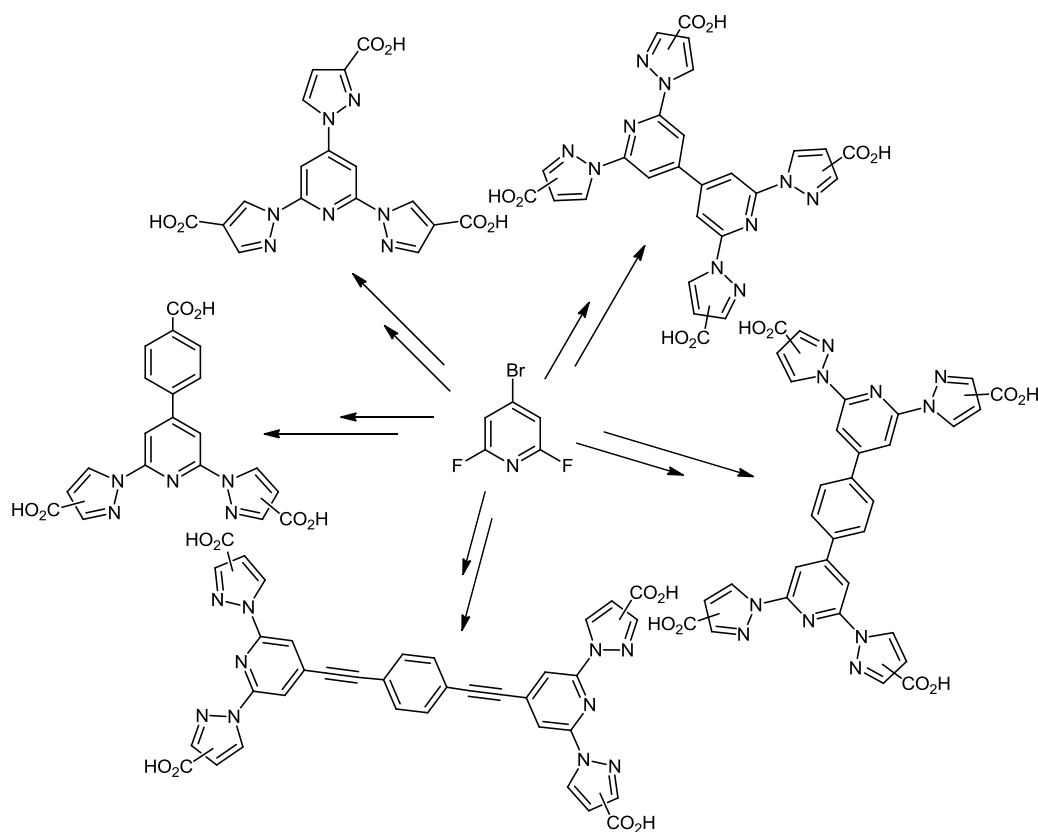


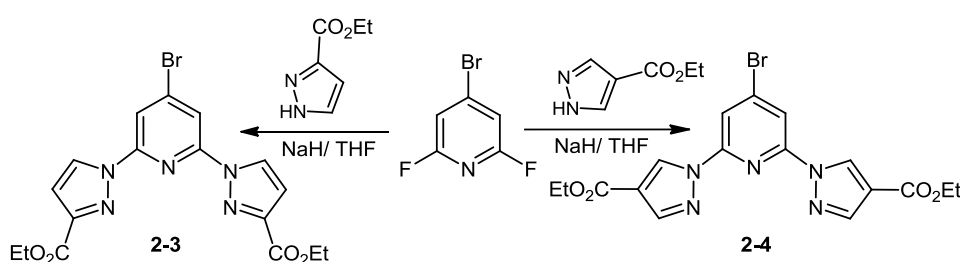
Figura 5.7

Como se puede observar hay un buen número de posibilidades, que incluyen las estructuras equivalentes con anillos de indazol, aumentando de manera significativa los ligandos que pueden ser utilizados como bloques estructurales a la hora de preparar diferentes MOFs, pero que no están limitados a los aquí representados, ya que existen numerosas alternativas para la introducción de distintos motivos, mono y bifuncionalizados sobre la posición 4-Br de la piridina mediante las inagotables

reacciones de acoplamiento cruzado con un número casi ilimitado de reactivos de tipo derivados de Boro, Silicio, Halógenos, organometálicos, etc.¹³⁶

El primer paso para la síntesis de las diferentes estructuras propuestas en la Figura 5.7 es la sustitución nucleófila aromática de los dos átomos de flúor por los anillos de *n*-etoxicarbonilpirazol correspondiente para obtener el derivado bromado correspondiente, la 4-bromo-2,6-bis(3-etoxicarbonilpirazolilpiridina) (**2-3**) y la 4-bromo-2,6-bis(3-etoxicarbonilpirazolilpiridina) (**2-4**).

Esta reacción transcurre utilizando las condiciones habituales descritas en el capítulo 4.1, como muestra el Esquema 5.7.



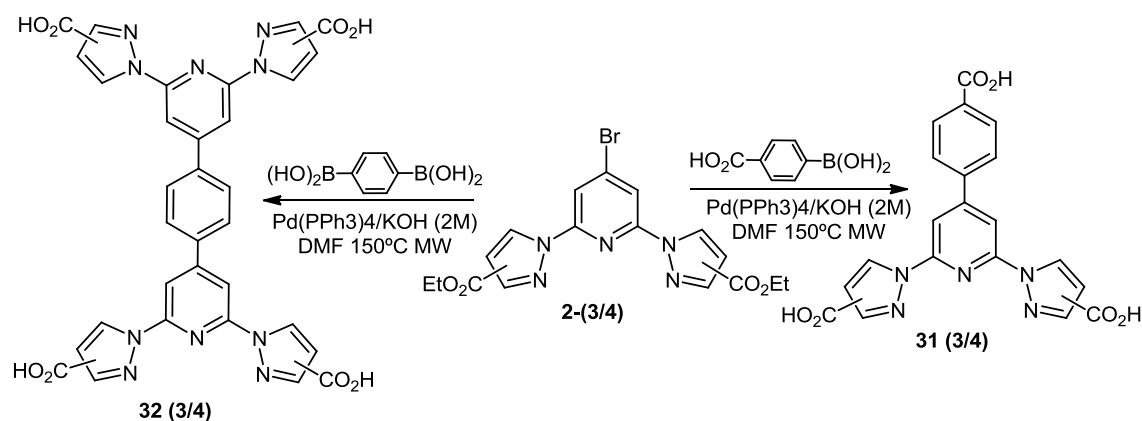
Esquema 5.7

Preparación de precursores mediante la reacción de Suzuki-Miyura

Ante todas las posibilidades propuestas, se comenzó por aquellos ligandos que pueden ser sintetizados a través de acoplamientos de tipo Suzuki, ya que la puesta a punto de esta reacción mediante el empleo de microondas llevada a cabo para las reacciones de acceso a las antenas moleculares, hacía esperar una síntesis limpia y rápida de los precursores elegidos.

Así, para obtener los ligandos **31** se lleva a cabo la reacción de Suzuki mediante las condiciones descritas en el Esquema 5.8 haciendo reaccionar la correspondiente bispirazolilpiridina **2** (**3** y **4**) con el ácido 4-carboxifenilborónico. Atendiendo a las condiciones puestas a punto para este tipo de reacciones, éstas nos permiten obtener los diferentes derivados deseados ya hidrolizados y en forma de sales potásicas. Los espectros de ¹H-RMN de estos productos muestran de modo inequívoco la introducción del anillo aromático *para*-sustituido unido a la piridina.

¹³⁶ Metal-catalyzed Cross-coupling Reactions. F. Diederich, P.J. Stang Eds., 2nd ed., Wiley-VCH, 2004, Weinheim



Esquema 5.8

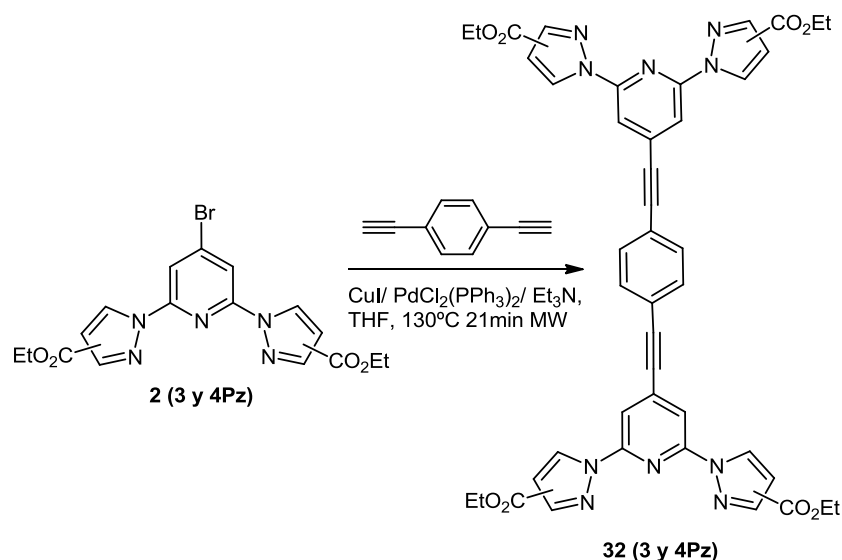
Hay que señalar que, pese a que en alguna ocasión se han observado pequeñas proporciones correspondientes a productos sin hidrolizar o parcialmente hidrolizados, el aumento de la concentración de KOH permite obtener los productos deseados totalmente convertidos en su forma de sal potásica.

Para la obtención del derivado **32** se hacen reaccionar dos equivalentes del ligando **2** con un equivalente del ácido benzo-1,4-diborónico. El tiempo de reacción tuvo que ser ajustado ya que el doble acoplamiento requiere de más tiempo de reacción. De esta manera, tras aplicar dos ciclos de radiación microondas de 15 minutos cada uno, se obtienen, de nuevo, los productos deseados como sales potásicas.

Preparación de precursores mediante la reacción de Sonogashira

La reacción de Sonogashira entre dos equivalentes del derivado bromado **2** correspondiente y un equivalente el 1,4-dietinilbenceno¹³⁷ conduce con buenos rendimientos al producto de doble acoplamiento (Esquema 5.9). Las reacciones fueron llevadas de modo diferente a las restantes reacciones de Sonogashira llevadas a cabo hasta este punto, ya que se pusieron a punto mediante radiación microondas. Las descritas hasta ahora solo involucraban la reacción de un equivalente de etinilbenceno con un equivalente del derivado bromado, lo que requiere menores tiempos de reacción para completarse que en este caso, por lo que un aumento del tiempo de reacción de 11 a 21 minutos completa la reacción.

¹³⁷ T.M. Fasina, J.C. Collings, D.P. Lydon, D. Albesa-Jove, A. S. Batsanov, J.A.K. Howard, P. Nguyen, M. Bruce, A.J. Scott, W. Clegg, S.W. Watt, C. Viney, T.B. Marder. *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 2395.

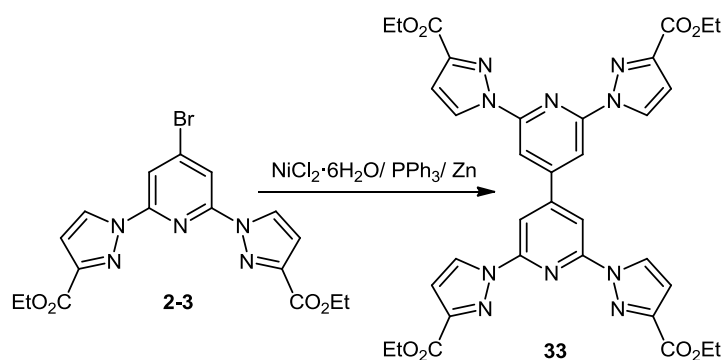


Esquema 5.9

En las reacciones de Sonogashira, utilizando microondas no se produce la hidrólisis, ya que no se emplea una base hidroxilada a diferencia de las reacciones de Suzuki, por lo que es necesario una etapa de saponificación, utilizando las condiciones generales puestas a punto para este proceso. La posterior neutralización del producto utilizando ácido clorhídrico (10%) da lugar a los tetraácidos **32** (**3** y **4**).

Preparación de precursores mediante acoplamiento Zn/Ni

La ruta sintética propuesta para acceder a ligandos derivados de 4,4'-bipiridina (**33**) se recoge en el Esquema 5.10.



Esquema 5.10

La obtención de la 2,2',6,6'-Bis(3-etoxicarbonilpirazolil)-4,4'-bipiridina (**33-3**) se realiza según el método descrito por Tiecco y cols.,¹³⁸ a partir de complejos de Ni(0).

¹³⁸ M.Tiecco, L.Testaferri, M.Tingoli, D.Chianelli, M.Montanucci, *Synthesis*, **1984**, 736.

Este método descrito para halopiridinas, conduce a bisheterociclos con buenos rendimientos.¹³⁹ Tiene la ventaja de que la preparación del catalizador de Ni(0), altamente sensible al aire, Ni(PPh₃)₄, se genera *in situ* a partir de NiCl₂, el cual es reducido por Zn en presencia de trifenilfosfina.

Tras la generación del catalizador en DMF, se adiciona la 4-bromo-2,6-bispirazolilpiridina correspondiente. La reacción de acoplamiento se completa al cabo de 24 horas obteniéndose los productos **33-3**.

Los datos espectroscópicos de ¹H-RMN concuerdan con la estructura propuesta, observándose un desapantallamiento de las señales, respecto al ligando **2-3**, la señal del protón de la piridina es el más afectado y se encuentra a 8.40ppm, mientras que en el producto de partida **2-3**, este protón se encuentra a una desplazamiento de 8.25ppm.

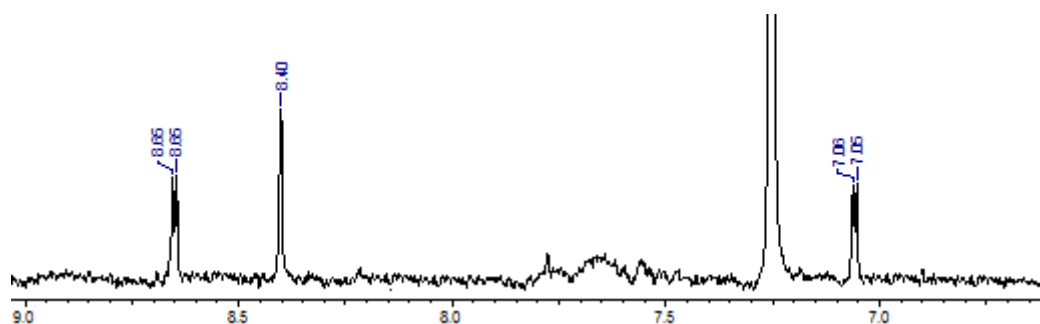


Figura 5.8

¹³⁹ C. Klein, E. Baranoff, M. Grätzel, Md. K. Nazeeruddin. *Tetrahedron Lett*, **2011**, 52, 5, 584.

9.2. Estudio morfológico y estructural de los geles.

La formación de geles de origen orgánico es un fenómeno del que, aunque en los últimos años han aparecido numerosas publicaciones en la bibliografía por sus posibles aplicaciones,¹⁴⁰ los diferentes autores no han podido sentar unas bases que permitan prever las características que deben de poseer los denominados “gelificantes” para producir este efecto, en el que el disolvente y la capacidad de formación de enlaces de hidrógeno parecen ser las principales variables a tener en cuenta. En este sentido, en mayoría de casos la formación de geles es pura *serendipia*, término que se debe de aplicar también de modo literal a los geles encontrados por nosotros.

El término de geles supramoleculares puede ser utilizado para abarcar a cualquier gelificante que forma este tipo de estructuras mediante interacciones no covalentes. Sin embargo, se ha venido utilizando para describir geles formados por compuestos de bajo peso molecular que se autoensamblan en disolución para formar el gel. Este motivo hace de la elección del disolvente un componente esencial para la formación de los geles, así, éstos pueden ser clasificados como organogeles o hidrogeles dependiendo de si el disolvente es orgánico o es acuoso. Estos disolventes han de favorecer las interacciones no covalentes, como como los enlaces de hidrógeno, interacciones π - π , la coordinación metal-ligando, fuerzas de van der Waals, efectos hidrófobos, etc., para generar estructuras de mayor orden como nanofibras, nanoláminas, nanoesferas, etc., que dan lugar a la formación de los geles supramoleculares.

La naturaleza débil y reversible de las interacciones no covalentes, que mantienen estas nanoestructuras unidas entre sí, son las responsables de la capacidad inherente de estos geles para responder a los estímulos externos, por ejemplo, respuesta térmica (puede producirse una transición sol-gel a una temperatura determinada, $T_{\text{gel-sol}}$), estas interacciones pueden dotar al gel de interesantes propiedades mecánicas, tales como la autoreparación. Por lo tanto, estos geles son prometedores candidatos para un amplio

¹⁴⁰ A. R. Hirst, B. Escuder, J. F. Miravet, D.K. Smith, *Angew.Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 8002.

rango de aplicaciones como biomateriales,¹⁴¹ sensores,¹⁴² plantillas para la generación nanoestructuras,¹⁴³ cristales líquidos¹⁴⁴ y sistemas electrónicos¹⁴⁵ entre otros.

Estas propiedades y aplicaciones de los geles obtenidos, en la síntesis de las subunidades para la formación de los materiales híbridos, han hecho de ellos unos excelentes candidatos para un estudio más detallado.

En nuestro caso, se observó por primera vez la formación de los geles en la fase de neutralización del compuesto 26-4, que estaba disuelto a pH básico en la fase acuosa de la reacción de hidrolisis.

Por este motivo, se realizaron pruebas a distintos pH's. Como se observa en la Imagen 4, al acidificar la muestra comienza la formación del gel. El hecho de que los geles se formen a pH ácido parece sugerir que estos se formarían mediante interacciones por enlaces de hidrógeno entre los ácidos carboxílicos presentes en la estructura y que por su orientación podrían originar estructuras tridimensionales que incluyen en sus huecos las moléculas de agua.

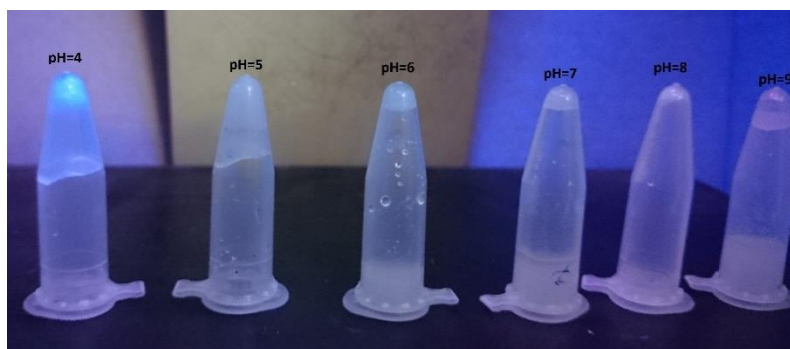


Imagen 4. Escala de pH para disoluciones acuosas del compuesto **26-3**.

Los geles formados han sido estudiados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), la cual proporciona las imágenes de la superficie de las muestras e información de la composición elemental de la superficie, mediante un análisis espectrográfico. La

¹⁴¹ S. I. Stupp, *Nano Lett.*, **2010**, 10, 4783; M.J. Webber, J.A. Kessler, S.I. Stupp, *J. Intern. Med.*, **2010**, 267, 71; G.A. Silva, C. Czeisler, K.L. Niece, E. Beniash, D.A. Harrington, J.A. Kessler, S.I. Stupp, *Science*, **2004**, 303, 1352.

¹⁴² D. Bardelang, M. B. Zaman, I. L. Moudrakovski, S. Pawsey, J. C. Margeson, D. Wang, X. Wi, J. A. Ripmeester, C. I. Ratcliffe and K. Yu, *Adv. Mater.*, **2008**, 20, 4517; J. J. D. de Jong, L. N. Lucas, R. M. Kellogg, J. H. van Esch and B. L. Feringa, *Science*, **2004**, 304, 278

¹⁴³ D. B. Amabilino and J. Puigmarti-Luis, *Soft Matter*, **2010**, 6, 1605

¹⁴⁴ J.-H. Wan, L.-Y. Mao, Y.-B. Li, Z.-F. Li, H.-Y. Qiu, C. Wang G.-Q. Lai, *Soft Matter*, **2010**, 6, 3195.

¹⁴⁵ S. Yagai, S. Kubota, T. Iwashima, K. Kishikawa, T. Nakanishi, T. Karatsu, A. Kitamura, *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 5246

preparación de las muestras es relativamente fácil sólo requieren que estas sean conductoras. De esta forma, la muestra es recubierta con una capa delgada de oro para conferirle carácter conductor, motivo por el cual las muestras han de estar secas.

Se han estudiado de los distintos geles obtenidos, concretamente los trisprazolil derivados de piridina **27-4** y **27-3**, así como el triácido bispirazólicos **31-4** obtenido en la reacción de Suzuki con el ácido 4-carboxilborónico.

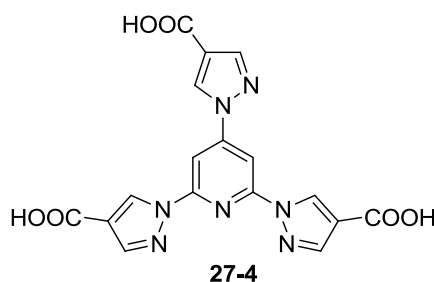
La morfología de los geles ha sido también estudiada mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución (SEM), la cual proporciona imágenes de la superficie de mayor detalle que las obtenidas el equipo de SEM y análisis químico.

Ambas técnicas requieren que la muestra esté seca. Por este motivo se ha llevado a cabo un estudio con el fin de observar la influencia que tiene el método de deshidratación del gel sobre su apariencia y estructura. Para ello se tomaron diferentes muestras del gel que fueron deshidratadas en diferentes condiciones:

- Liofilización.
- Dsecación a vacío.
- Deshidratación lenta llevada a cabo en un desecador en presencia de gel de sílice sin aplicar ciclos de vacío.

Al comparar las imágenes del gel liofilizado, secado con vacío y deshidratado con gel de sílice, se pueden observar diferencias en la apariencia de las muestras. En los secados rápidos, como de liofilización o en desecador con vacío, se observa unas estructuras globulares que coexisten con materiales de aspecto laminar, diferenciándose muy bien las capas del material, tanto en las áreas de estructura abierta como globular. En cambio para los secados más lentos con gel de sílice se observa estructuras más compactas con menos distancia interlaminar y menor presencia de formas globulares.

9.2.1. Estudio del gel del compuesto **27-4**.



2- Gel de **27-4**, Desecador con vacío.

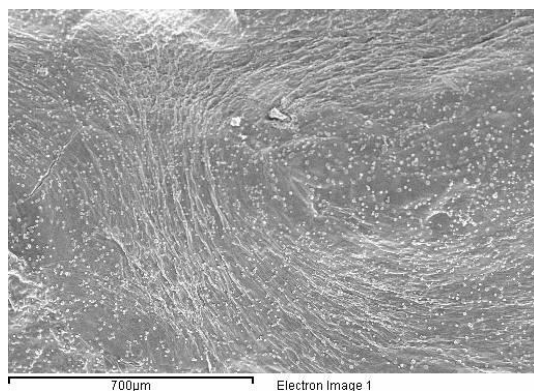


Imagen 5

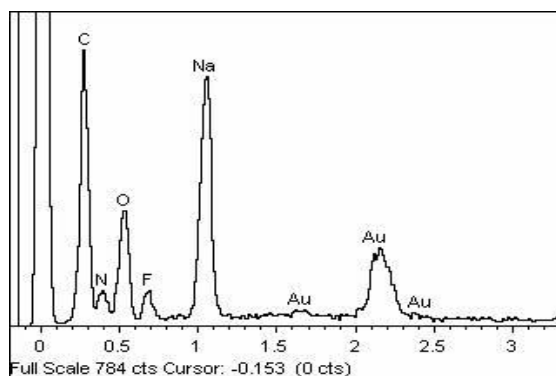


Imagen 6

La imagen 5, muestra la superficie del compuesto **27-4**, secado a vacío. Sobre esta muestra se realizó un análisis químico para determinar su composición elemental, imagen 6. Este análisis revela la presencia de sodio, que puede acompañar el gel como consecuencia de la neutralización del medio básico de la saponificación, aunque tampoco se puede descartar aun su participación en la estructura tridimensional que genera el gel.

La imagen presenta sobre la superficie la existencia de estructuras globulares repartidas de modo más o menos uniforme, que se repiten y discuten más en detalle en algunas de las otras muestras desecadas en distintas condiciones.

También se observa en la muestra una pequeña cantidad de flúor. Posiblemente debida a trazas de fluoruro sódico generado en la reacción de sustitución y que no es eliminado completamente en el tratamiento de la reacción. Se descarta que pueda deberse al reactivo de partida 2,4,6-triflororopiridina o alguno de los productos producidos por sustitución parcial, ya que en los espectros de RMN no se observan este tipo de compuestos .

Imágenes de microscopía de barrido de alta resolución SEM

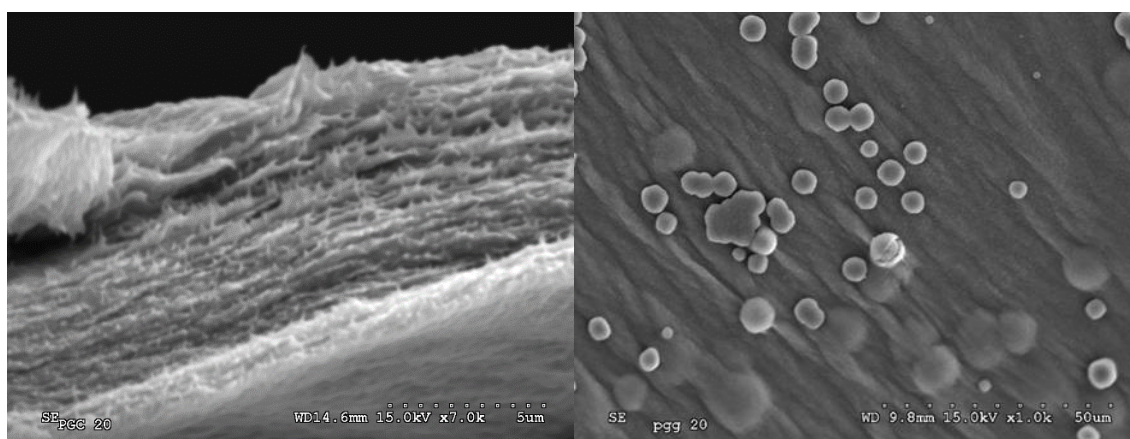


Imagen 7

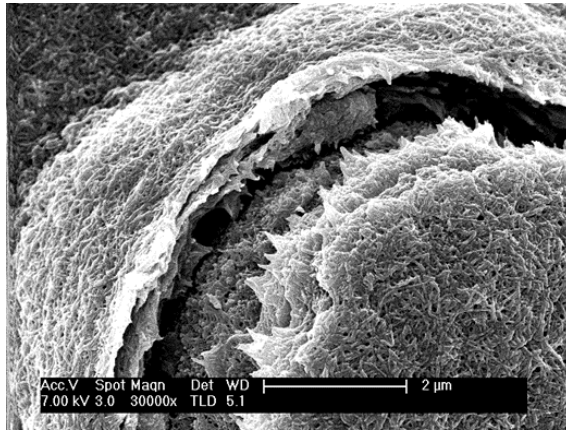


Imagen 8

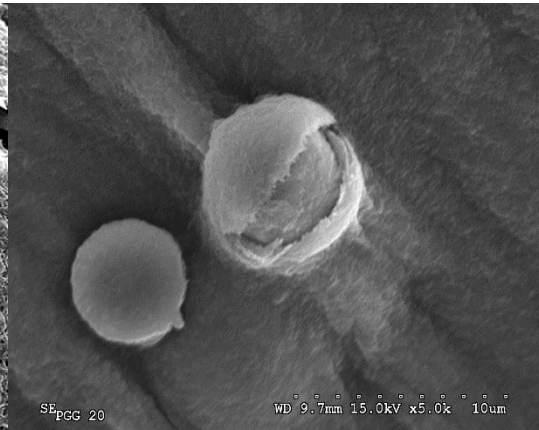


Imagen 9

Imagen 10

En el caso de estas imágenes, la deshidratación tuvo lugar mediante la deposición de una “gota” del gel en un papel desecante que fue sometido también a un proceso de vacío durante 2 horas. Se pueden observar estructuras globulares comentadas. Las imágenes 9 y 10 muestran la composición de una de estas estructuras globulares. Se pueden observar que están formadas por capas laminares concéntricas, y que a su vez estas láminas están formadas por una red de fibras.

Cabe destacar, que pese a la presencia de las estructuras globulares, mediante este método de secado la formación de una estructura multicapas es la predominante, como muestra la imagen 7, en la cual es posible diferenciar las capas con claridad. Las capas están formadas por una red de hebras entrelazadas.

1- Gel de 27-4, liofilizado.

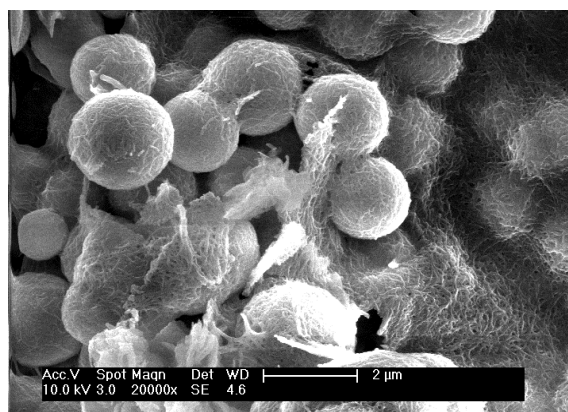


Imagen 11

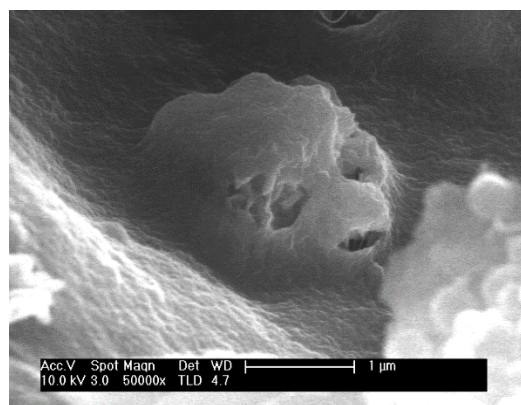


Imagen 12

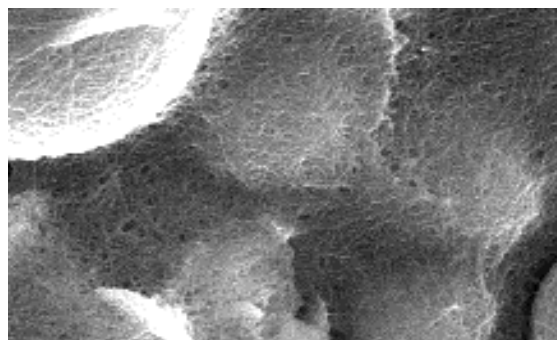


Imagen 13

La liofilización elimina el agua mediante ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, pero preservando más intacto el esqueleto estructural de la sustancia liofilizada. En esta muestra se puede observar de nuevo la presencia estructuras globulares de diámetro en torno a las 2 micras, pero en una mayor abundancia que sobre la muestra anterior, como verse en la imagen 11. Estas estructuras aparecen en algunos casos abiertas pudiéndose ver la estructura laminar concéntrica de la que están constituidas, imagen 12. De esta manera se constataría la presencia de moléculas de agua formando parte de la estructura mediante puentes de hidrogeno. La imagen 13 muestra, de nuevo, la estructura fibrilar entrecruzada que presenta el gel deshidratado mediante esta técnica sobre el que se aprecian las estructuras globulares incluidas.

3- Gel de 27-4, Desecador con gel se sílice, sin vacío.

El secado de la muestra durante 3 días en un desecador sin aplicar ciclos de vacío consigue una estructura más compacta que en los casos anteriores. En la imagen 14 se

observa la presencia de estructuras globulares como en los casos anteriores, aunque éstas son mucho más escasas, ya que no se observan de modo regular sobre la superficie. Además, la influencia del tiempo de secado puede apreciarse en la estructura multicapas, que en este caso es más compacta y uniforme que en el caso anterior. En este caso la separación entre las capas es más difícil de distinguir, imagen 15, aunque la estructura fibrilar se puede también distinguir en la superficie del material.

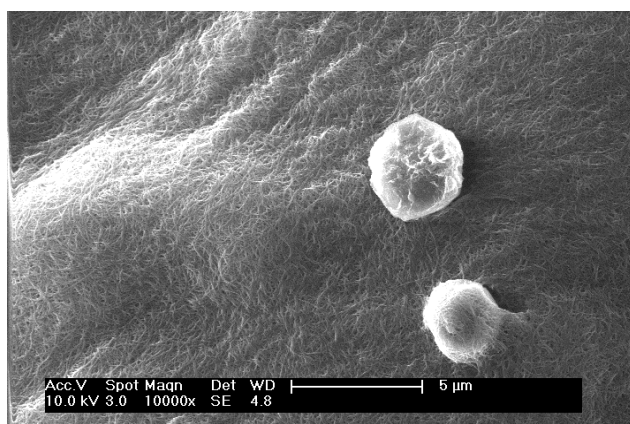


Imagen 14

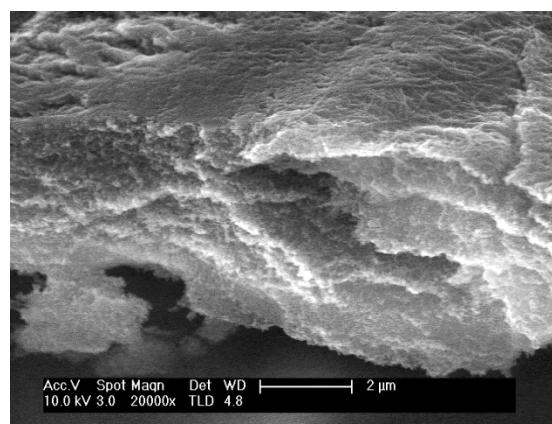


Imagen 15

De esta manera se ha observado como un secado lento conlleva la formación de una estructura laminar compacta, mientras que el proceso de liofilización muestra las estructuras globulares, similares a micelas, de las que debe estar formado el gel, al producirse una evaporación más rápida. Esto pone de relieve la importancia del método de secado para el estudio morfológico de la muestra.

9.2.2. Estudio del gel del compuesto **27-3**.

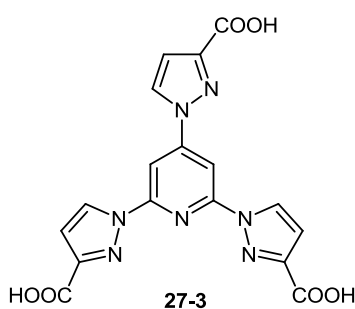


Figura 5.9

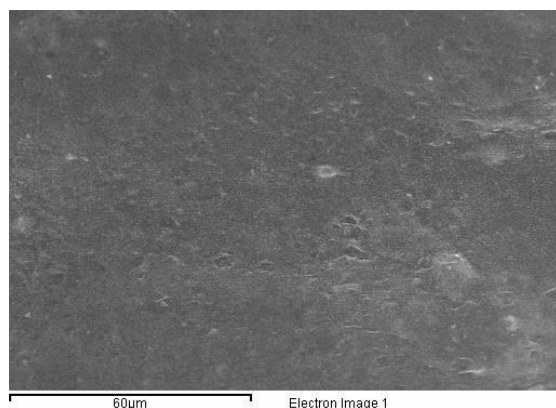


Imagen 16

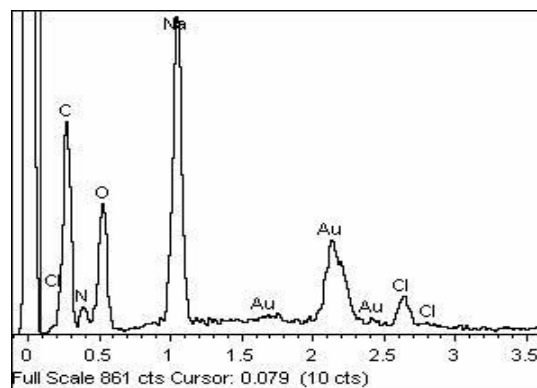


Imagen 17

El estudio de la superficie mediante microscopía electrónica de barrido, imagen 16, muestran una superficie más homogénea de la muestra sin la presencia de estructuras globulares. En el análisis químico elemental de la superficie se observa la presencia de nuevo de sodio, aunque en este caso el tratamiento de la muestra ha provocado la desaparición de flúor en su composición, imagen 17.

La deshidratación de este compuesto se llevó a cabo en un desecador al que se le aplicaron ciclos de vacío. En este caso, al igual que la imagen 10, se puede diferenciar la estructura laminar que presenta el compuesto. En las imágenes 19 y 20, tomadas con menor acercamiento, se puede observar que la superficie está formada por fibras entrecruzadas.

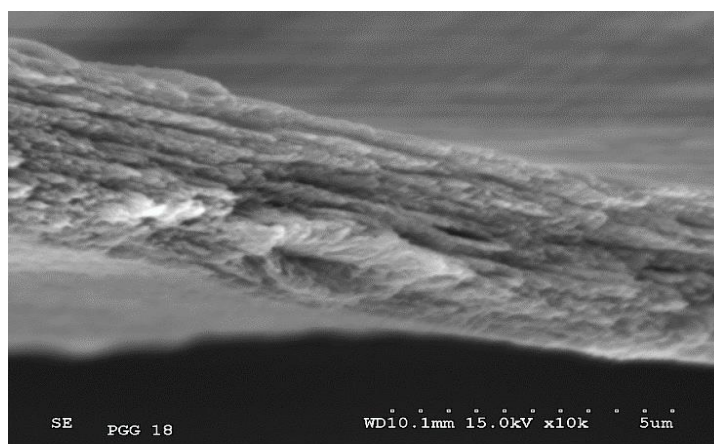


Imagen 18

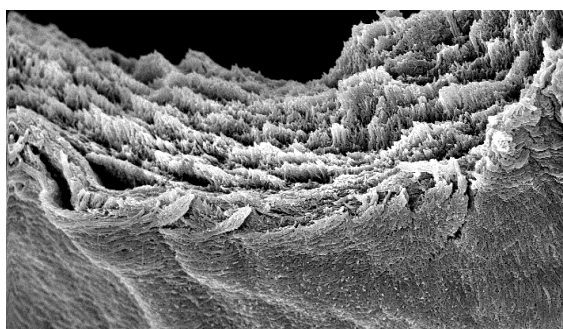


Imagen 19

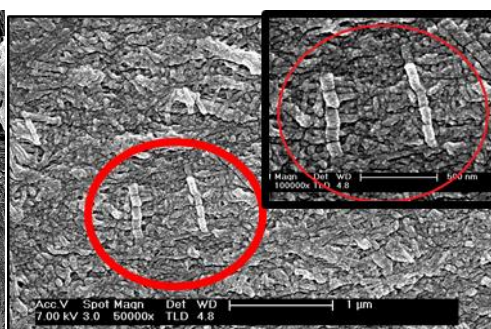


Imagen 20

9.2.3. Estudio del gel del compuesto **31-4**

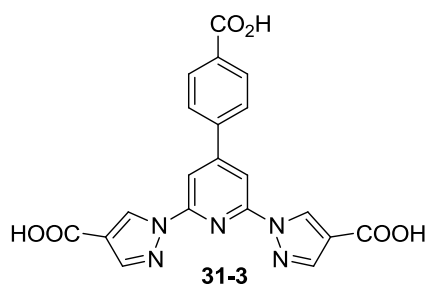


Figura 5.10

*Gel de **31-4**, Desecador con gel de sílice, sin vacío.*

La superficie de este gel muestra una estructura fibrilar entrecruzada, en la que las fibras están orientadas principalmente en tres direcciones, este hecho posiblemente esté relacionado con su geometría molecular y la previsible disposición coplanar de los dos anillos de 6 eslabones, piridina y fenilo, imágenes 21 y 22. Además, este entrecruzamiento genera una superficie con apariencia más compacta que en los casos anteriores. Al aumentar los aumentos a los que son tomadas las imágenes, se observa que la distancia interlaminar es mucho menor que en los otros geles, siendo muy difícil apreciar la separación interlaminar. Imágenes 23 y 24.

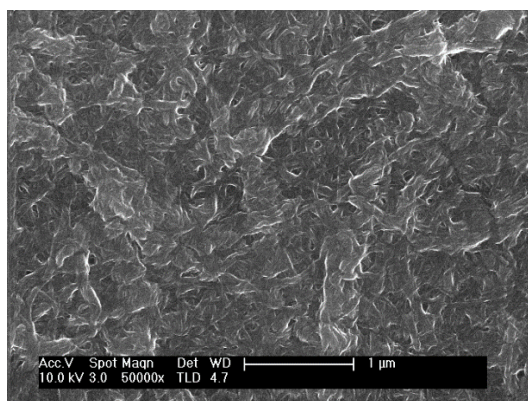


Imagen 21

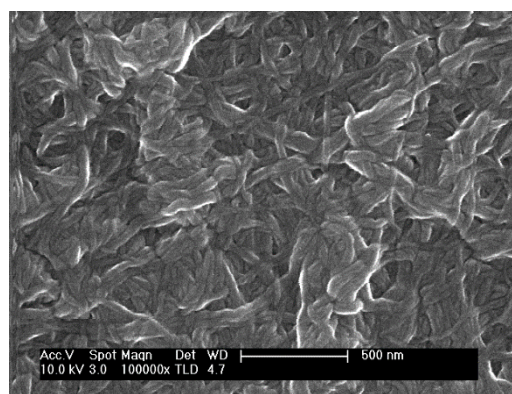


Imagen 22

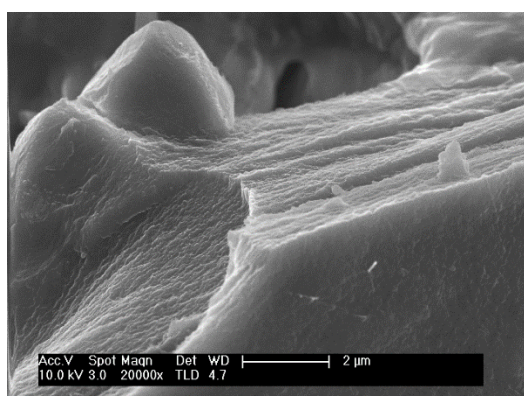


Imagen 23

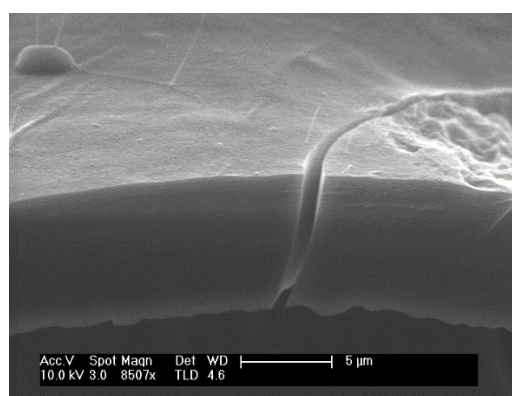


Imagen 24

Esta compilación de láminas con menor distancia entre ellas puede ser debido a que la simetría de la estructura, que posee un eje C_2 permite un mayor apilamiento de las estructuras, previsiblemente más planas, la presencia del fenilo como sustituyente en 4 en lugar de un pirazol, que son π -deficientes, proporciona un entorno más favorable para las interacciones π - π , creando como consecuencia la estructura compacta observada (Figura 3.10).

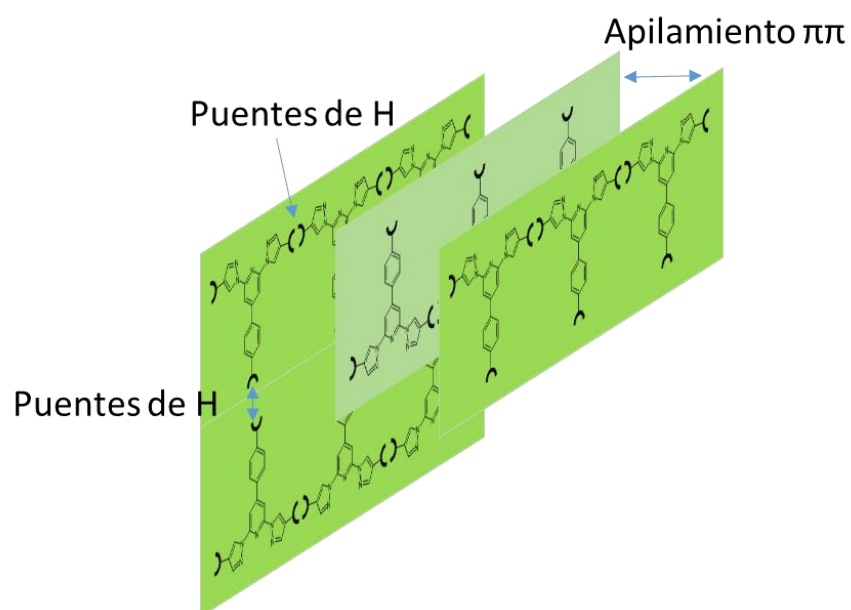


Figura 5.11

9.3. Diseño y Síntesis de MOFs

9.3.1. Elección de ligandos orgánicos y métodos.

Con el abanico de estructuras sintetizadas que se han descrito hasta ahora, el siguiente paso a la hora de abordar la preparación de MOFs ha sido la elección de las estructuras con las que se ha comenzado este estudio preliminar. Las estructuras elegidas se representan en la Figura 5.12.

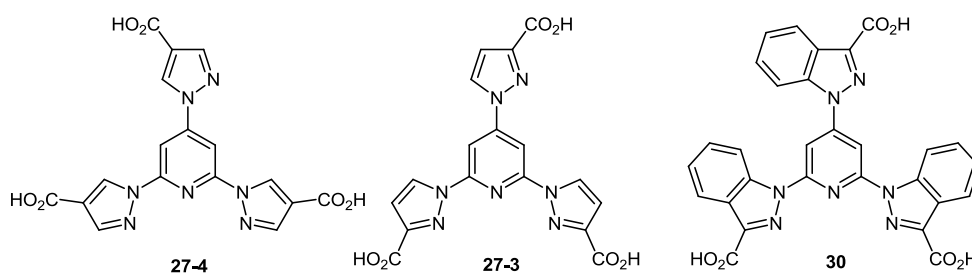


Figura 5.12 Unidades estructurales elegidas para la síntesis de MOFs luminiscentes (LnMOFs)

Se eligieron estas estructuras ya que se obtienen en tan solo dos pasos de reacción (sustitución nucleófila seguida de la etapa de saponificación) a partir de la 2,4,6-trifluoropiridina con altos rendimientos y por consiguiente son estructuras de las que se puede disponer de forma rápida y en buenas cantidades.

A la hora de enfrentarse al desafío de sintetizar nuevos MOFs con estructuras no descritas en la bibliografía, son muchos los parámetros experimentales y variables que han de tenerse en cuenta, y del control de estos depende la obtención del material deseado. Las modificaciones de estos parámetros pueden influir de manera decisiva en la arquitectura y propiedades del material. Estos parámetros pueden dividirse en dos tipos: procedimentales y químicos.

Procedimentales:

Método de síntesis: Existe una amplia variedad de metodologías sintéticas para la obtención de MOFs, (mediante reacciones en disolución homogéneas o heterogéneas, y reacciones en estado sólido). En este trabajo el método elegido para la síntesis de MOFs ha sido, como se mostrará más adelante, el método solvotermal utilizando agua como disolvente.

Temperatura: El rango de temperatura depende de la metodología sintética elegida. En nuestro caso para las reacciones solvotermales, que se llevan a cabo en recipientes a presión (autoclave), es necesario el empleo de altas temperaturas, siempre

por encima de la temperatura de ebullición del disolvente, en el caso del agua, ($T^a > 100^{\circ}\text{C}$).

Tiempo: El rango de tiempos también es muy amplio, pudiendo ser desde pocos minutos, si la síntesis es asistida por microondas, hasta varios días o semanas. En este trabajo el tiempo de reacción elegido para para la síntesis de los MOFs es de 72 horas.¹⁴⁶

Químicos

Concentración de reactivos: La relación metal/ligando así como la dilución de la mezcla ha de ser controlada. En algunos casos se pueden obtener diferentes materiales cambiando la concentración de los reactivos.

Sales metálicas: Entre el amplio abanico de sales metálicas, de lantánidos en nuestro caso, que pueden ser empleadas (cloruros, acetatos, óxidos, triflatos...). Normalmente se utilizan aquellas cuyos aniones presenten menos capacidad coordinante para favorecer el desarrollo de la reacción por coordinación del ligando. Además ha de tenerse en cuenta que algunos aniones pueden influir en el pH del medio. También existe la posibilidad de formar un material con un metal y después realizar un dopaje con el ion lantánido para conseguir estudiar su influencia en las propiedades luminescentes.

Disolventes: Se suelen emplear disolventes orgánicos (etanol, metanol, acetonitrilo...) o agua, dependiendo de los reactivos y sales utilizados. En este trabajo se utilizará agua como disolvente en todos los ensayos para la síntesis de MOFs.

pH: La variación del pH de la reacción permite controlar la desprotonación parcial o total de los ligandos orgánicos empleados, y también la solubilidad de las sales metálicas. Por ejemplo el empleo de un pH básico al utilizar iones lantánidos produce la formación de los correspondientes hidróxidos del lantánido, que son muy insolubles, disminuyendo la concentración del metal *reactivo* presente en la mezcla.

Técnicas empleadas en la síntesis de materiales híbridas.

Existen un gran número de técnicas y métodos para conseguir con éxito la síntesis de nuevos materiales híbridos. Algunas de las vías de acceso más utilizadas en la síntesis de

¹⁴⁶ S. Alves jr. Comunicación personal. Universidad Federal de Pernambuco, Recife. Brasil

MOFs son los métodos solvotermales¹⁴⁷, sonoquímicos,¹⁴⁸ mecanoquímicos¹⁴⁹ y la síntesis en microondas.^{147a,150}

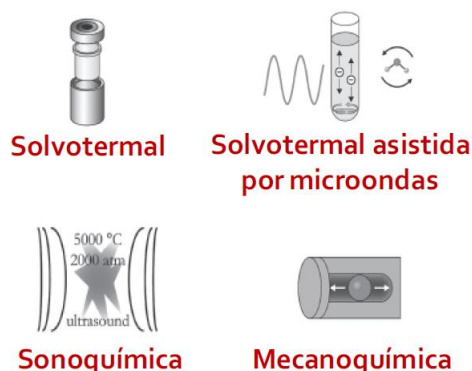


Figura 5.13

Pero de entre todos ellos los métodos solvotermales son, sin lugar a dudas, los más empleada en la síntesis de MOFs y es el método que ha sido utilizada para el desarrollo preliminar de este trabajo.

En la síntesis de MOFs mediante el método solvothermal las condiciones de presión y temperatura que se alcanzan permiten la obtención de estructuras poliméricas que difícilmente se lograrían mediante otros métodos convencionales. En este método la disolución se calienta por encima de su punto de ebullición generando una sobrepresión. Cuando el disolvente es agua, como en los ensayos que se expondrán a continuación, esta técnica recibe el nombre de síntesis hidrotermal.

En este método el crecimiento cristalino se lleva a cabo en un autoclave, compuesto por un vaso de teflón, capaz de soportar las altas presiones y temperaturas de reacción, y un reactor de acero que contiene dicho vaso, como muestra la Figura 5.14.

¹⁴⁷ a) T.M. McDonald, W.R. Lee, J.A. Mason, M.B. Wiers, C.S. Hong, J.R. Long. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7056. b) V. Guillermin, F. Vagon, M. Dan-Hardi, T. Devic, M. Vishnuvartan, B. Campo, A. Vimont, G. Clet, Q. Yang, G. Maurin, G. Férey, A. Vittadini, S. Gross, C. Serre. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 9267; L. Ma, A. Jin, Z. Xie, W. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9905.

¹⁴⁸ S. Loera-Serna, M.A. Oliver-Tolentino, M. Lopez-Nunez, A. Santana-Cruz, A. Guzman-Vargas, R. Cabrera-Sierra, H.I. Beltran, J. Flores, *J. All. and Comp.* **2012**, *540*, 113; A. Tahmasian, A. Morsali. *Inorg. Chim. Acta*, **2012**, *26*, 13.

¹⁴⁹ P. Beldon, L. Fabian, R. Stein, A. Thirumurugan, a. Cheetham, T. Friscic. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 9640; N. Singh, M. Hardi, V.P. Balema. *Chem. Comm*, **2013**, *49*, 972.

¹⁵⁰ J. Klinowski, F.A. Almeida, P. Silva, J. Rocha. *J. Dalton. Trans.* **2011**, *40*, 321; W. Yang, J. Feng, S. Song, H. Zhang. *ChemPhysChem*. **2012**, *13*, 2734.

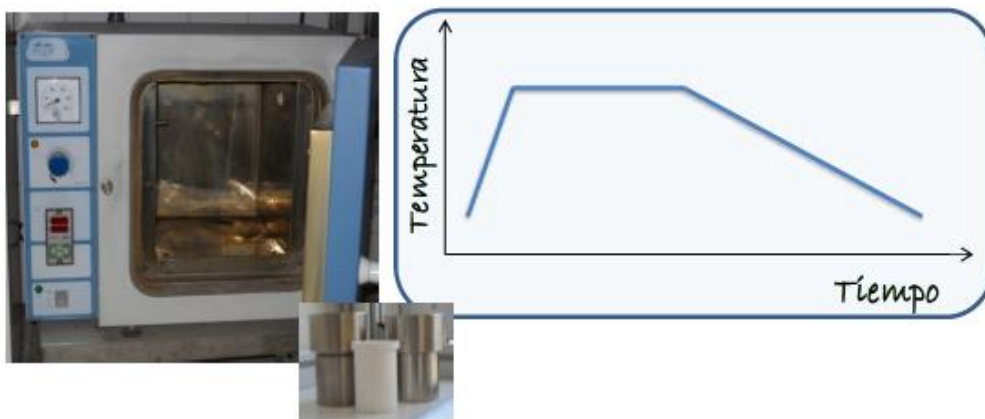


Figura 5.14

De esta manera, una vez elegidos las unidades estructurales, en las primeras aproximaciones de obtención de los correspondientes Ln/MOF's, se utiliza Europio como lantánido en su forma de EuCl_3 . Se lleva a cabo una reacción hidrotermal, utilizando reactores de teflón herméticamente cerrados, y sometidos una temperatura de 120°C .

9.3.2. Síntesis de MOFs utilizando el ligando 2,4,6-tris-(3-carboxil-1-pirazolil)piridina y 2,4,6-tris-(4-carboxil-1-pirazolil)piridina (**27-3** y **27-4**).

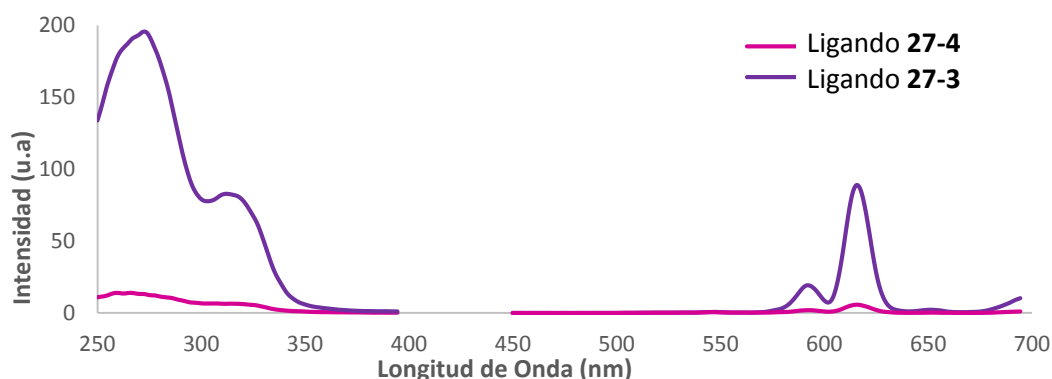
Como primera aproximación a la síntesis de materiales híbridos se estudió la reacción entre $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y los ligandos trispirazolicos **27-3** y **27-4**.

La síntesis se lleva a cabo utilizando dos equivalentes de ligando orgánico por cada equivalente de Europio. La disolución empleada tiene una concentración $2 \cdot 10^{-2}$ M (respecto al ligando) y $\text{pH} \approx 6$. El uso de pHs ligeramente ácidos es habitual en la síntesis de MOFs con restos de ácidos carboxílicos.

En la síntesis de estos materiales se utilizaron tiempos de reacción de 12 y 72 horas, para poder poner a punto el método para estos ligandos.

9.3.2.1. Propiedades luminiscentes

Las propiedades luminiscentes en este tipo compuestos derivados del 1-bpp se han puesto de manifiesto a lo largo de este trabajo. La Gráfica 5.1 muestra los espectros de excitación de los complejos de Eu con los ligandos **27-3** y **27-4** en disolución.



Gráfica 5.1 Espectro de Exc/em. de los complejos de Eu y **27-3** y **27-4** en disolución etanólica ($10^{-5}M$)

La mayor intensidad en el espectro para el compuesto **27-3** es debida probablemente a la mejor orientación de los grupos carboxílicos los cuales participan de modo activo en la complejación y permiten un mayor aislamiento del ion lantánido respecto del medio. En el caso del ligando **27-4**, los grupos carboxílicos están alejados de la estructura quelante del esqueleto bispirazolprididina por lo que no participan en la complejación del metal (Figura 5.15).

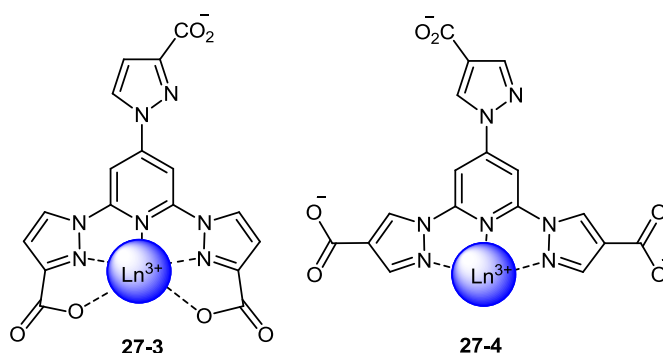


Figura 5.15

Las buenas propiedades quelantes que presenta el ligando **27-3** son una ventaja para diferentes aplicaciones, como las mostradas y discutidas a lo largo de los dos capítulos anteriores, pero en el caso de la síntesis de LnMOFs pueden jugar en su contra, ya que en la síntesis de MOFs se intenta crear una red / entramado en la que los ligandos estén unidos entre sí por fuerzas intermoleculares, como la coordinación con metales. De esta forma desde un punto de vista de supramolecular la estructura del ligando **27-4** sería más apta para la preparación de este tipo de materiales (Figura 5.16).

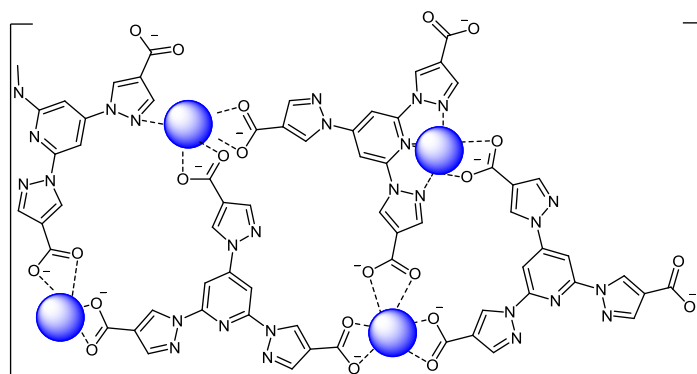


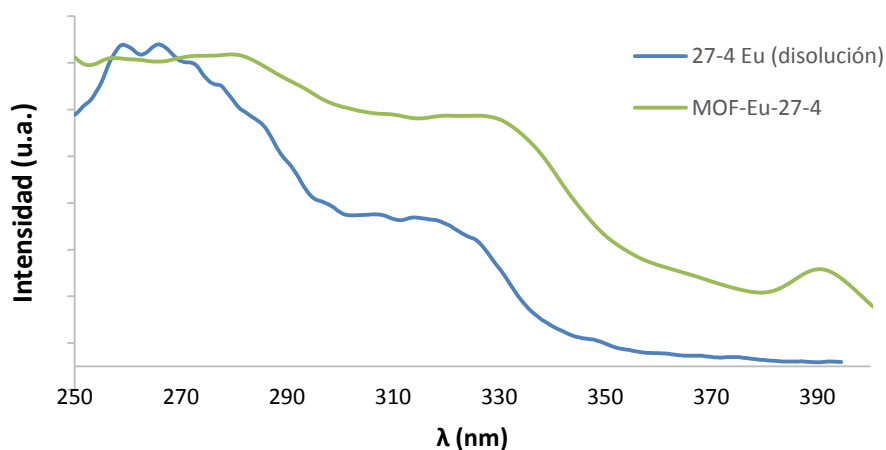
Figura 5.16

Sobre los materiales preparados, se han llevado a cabo medidas de la luminiscencia de los compuestos **27-3** y **27-4** en estado sólido, observando la excitación a la longitud de onda de emisión del Europio (616 nm). Los resultados se muestran en la Tabla 5.1.

	I (u.a) MOF	λ_{exc} (nm)MOF	λ_{exc} (nm) _{L-Eu} disolución
27-3	31	334	314
27-4	107	326	312

Tabla 5.1. λ_{exc} de los ligandos **27-3** y **27-4** en disolución y como unidad estructural en MOFs

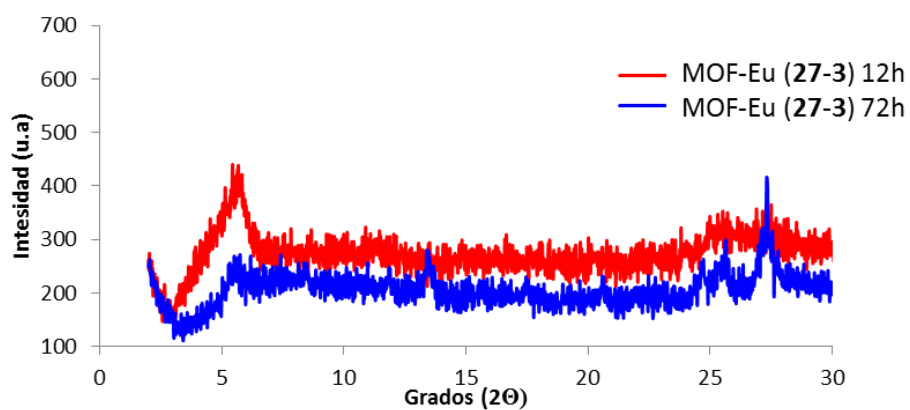
El desplazamiento batocrómico de los máximos de excitación en los MOFs respecto a sus respectivos complejos en disolución sería consecuencia del autoensamblaje entre los ligandos y el metal aunque no hay que olvidar que estos resultados comparan espectro en fases sólida y líquida, la reducción de los grados de libertad de los ligandos, ya sea por tratarse de fase sólida o por la estructura tridimensional polimérica de los MOFs, favorece una mayor conjugación entre los anillos al formar el material. En la Gráfica 5.2 se observa el desplazamiento batocrómico que se produce en el ligando **27-4** al superponer sus espectros de excitación de cuando está formando parte del material con Eu (Línea gris) y de su complejo con Eu en disolución (línea azul). También resulta reseñable la aparición de máximos de excitación en el material a longitudes de onda anormalmente altas (393nm)



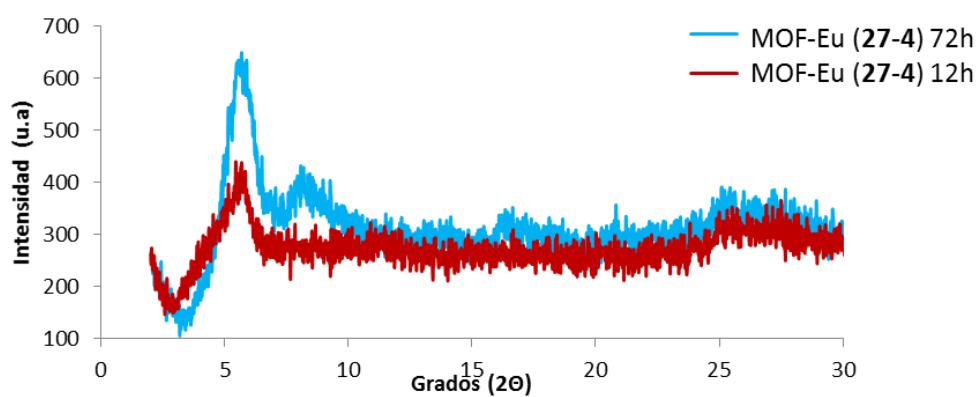
Gráfica 5.2 Comparación Complejo en Disolución y MOF con Eu

9.3.2.2. Estudio cristalográfico de los MOF's sintetizados.

Para estudiar el grado de cristalinidad de los MOF's obtenidos, se realizaron los correspondientes difractogramas de rayos X.



Gráfica 5.3. Difractograma Eu-MOF con el ligando **27-3**



Gráfica 5.4. Difractograma Eu-MOF con el ligando **27-4**

Los difractogramas de rayos X obtenidos muestran que se trata de materiales amorfos (Gráfica 5.3 y Gráfica 5.4). Las reacciones que se tuvieron durante 72 horas presentan pocas variaciones respecto a las reacciones en las que se mantuvo la temperatura durante 12 horas.

Esta baja cristalinidad podría apuntar a estructura tridimensionales no ordenadas como las observadas en los geles discutidos anteriormente. A la vista de estos resultados resulta necesario estudiar con más profundidad los hidrogeles obtenidos para estudiar su estructura e intentar la síntesis de estos MOFs de Europio en otras condiciones, buscando diferentes disolventes y condiciones en los que los ligandos puedan formar diferentes estructuras supramoleculares cristalinas.

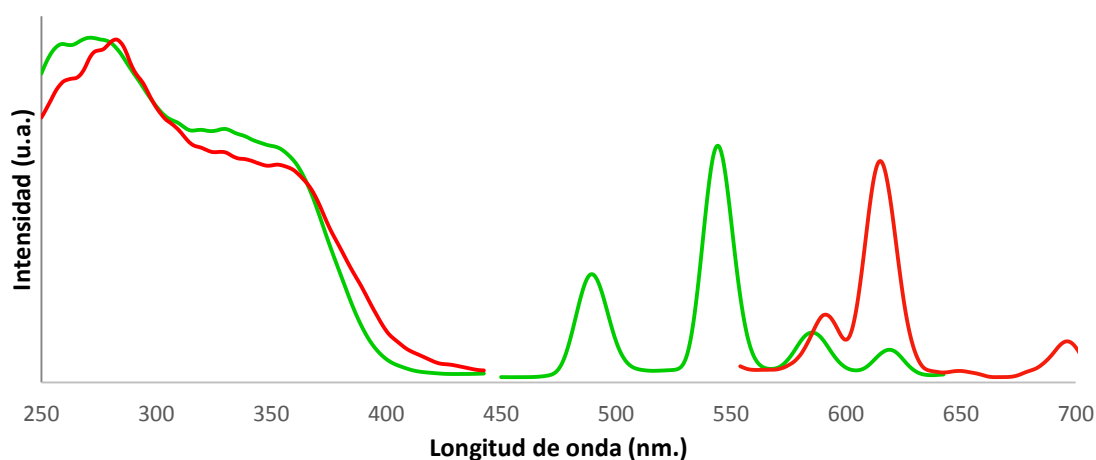
9.3.3. Síntesis de MOFs utilizando el ligando 2,4,6-tri-(3-carboxil-1-indazolil)piridina.

Como segunda aproximación en la síntesis de materiales híbridos se ha estudiado la reacción entre el ligando trisindazólico **30** y las sales de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

La síntesis hidrotermal de estos materiales se ha llevado a cabo utilizando una relación molecular 2:1, de ligando respecto a la sal del lantánido correspondiente, a una dilución de $2 \cdot 10^{-2}$ M y $\text{pH} \approx 6$, al igual que en el ensayo mostrado anteriormente.

Ambos ensayos con Europio y Terbio han sido sometidos a una temperatura de 120°C durante 72°C , tras lo cual el sólido ha sido aislado por filtración.

9.3.3.1. Propiedades luminiscentes



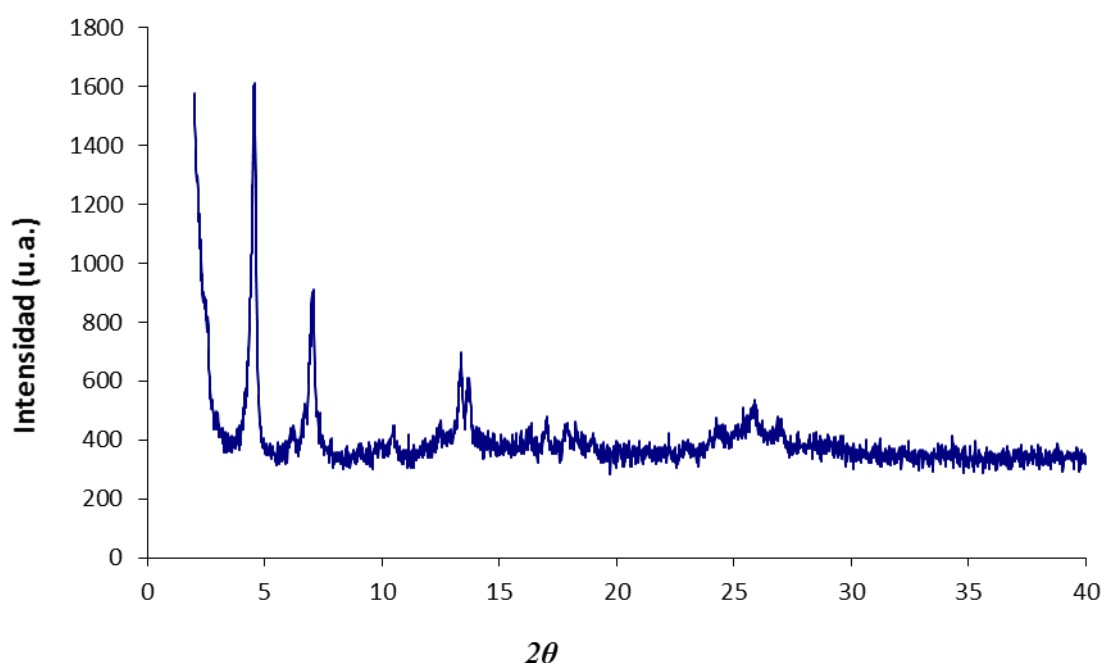
Gráfica 5.5 Espectros de excitación/emisión de fosforescencia en estado sólido de los materiales de Eu y Tb del ligando **30**

Se han llevado a cabo medidas de la luminiscencia de los compuestos sintetizados en estado sólido, midiendo la emisión a dos longitudes de onda distintas, $\lambda = 616$ y 545 nm para el MOF **Eu-30** y **Tb-30** respectivamente.

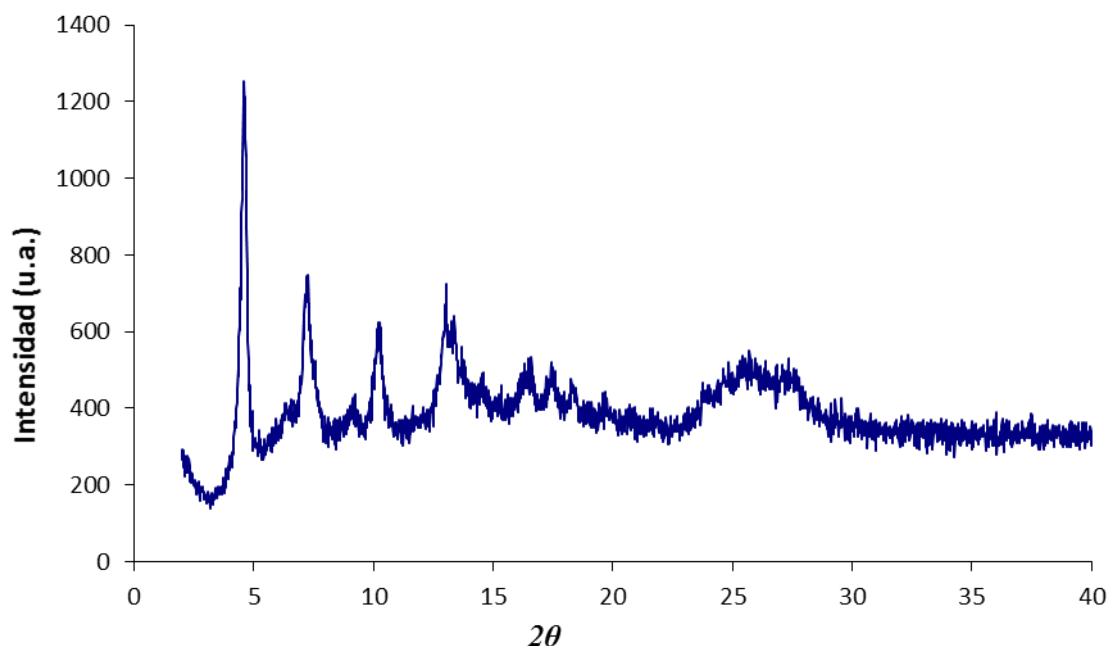
La similitud de los espectros de excitación del MOF-**Eu-30** y MOF-**Tb-30** son indicativos de que en ambos materiales la conformación de los ligandos orgánicos en torno al Europio y al Terbio es la misma.

9.3.3.2. Estudio cristalográfico de los MOF's sintetizados

Para estos materiales se han realizado los difractogramas de polvo representados en las gráficas 5.6 y 5.7.



Gráfica 5.6 Rayos X MOF-**30-Eu**



Gráfica 5.7 Rayos X MOF-30-Tb

Los datos de difracción de rayos-X muestran que las dos primeras difracciones a valores 2θ elevados son coincidentes en ambos materiales aunque el material de Terbio muestra una estructura más cristalina. Estas difracciones comunes apuntan a estructuras similares por lo que se puede deducir que el cambio de ion metálico no cambia sustancialmente la estructura del material. Actualmente se están realizando otros ensayos para obtener una mayor cristalinidad e intentar avanzar en la resolución de la estructura, así como en estudios analíticos (Fluorescencia de rayos X y TGA) para conocer las diferencias existentes en cuanto a composición entre los materiales preparados. Los resultados mostrados hasta aquí son muy preliminares pero entendemos que prometedores y son una muestra de cómo a partir de los desarrollos metodológicos puesto a punto en este trabajo se han abierto interesantes campos de investigación que se desarrollarán en un próximo futuro. Estos resultados constituyen el primer ejemplo de Ln-MOFs con este tipo de ligandos poliheterocíclicos voluminosos en los que se puede cambiar de modo sistemático la geometría de los grupos funcionales que controlan la disposición de estos bloques en los materiales.

6. Conclusiones

“En la vida no hay cosas que temer, solo cosas que comprender.”

Marie Curie

A lo largo de este trabajo se han mostrado los resultados más relevantes obtenidos en la síntesis de nuevos ligandos poliheterocíclicos y de sus complejos luminiscentes con iones lantánidos, y sus aplicaciones en los campos de la detección de secuencias de oligonucleótidos, en la generación de sondas luminiscentes de alta eficacia y en la preparación de materiales de tipo MOF luminiscentes.

Se ha demostrado la amplia versatilidad sintética como producto de partida de la 4-bromo-2,6-difluoropiridina. El empleo de esta piridina polihalogenada ha permitido el desarrollo de diferentes familias de ligandos con distintas funcionalizaciones para adaptarlos a los objetivos propuestos.

6.1. Conclusiones del capítulo 3

- Se ha desarrollado una metodología sintética para la obtención de sondas biológicas basadas en ligandos con una estructura poli-azaheterocíclicos capaces de complejar y sensibilizar iones lantánidos.
- La metodología sintética para la síntesis de los ligandos orgánicos está basada por un lado en la funcionalización selectiva y simultánea de ambos átomos de fluor seguida de la funcionalización ortogonal de la posición bromada en reacciones de acoplamiento cruzado vía paladio mediante el empleo de microondas, lo cual, mejora significativamente el rendimiento de las reacciones además de economizar tiempo, energía y disolvente. Adicionalmente se consigue una mejora en la reproducibilidad de la reacción al poder controlar la presión y temperatura de la misma en todo momento.
- Con el fin de estudiar las propiedades luminiscentes de los ligandos sintetizados, se han preparado los complejos con Eu(III) y Tb(III) con los éteres corona 12-c4 y 15-c-5 para la formación de complejos ternarios con los ligandos. Este método ha permitido conocer las propiedades luminiscentes de los ligandos, previo a su marcaje sobre oligonucleótidos. Los mejores resultados se obtienen de forma general para Tb(III) y en ligandos que presentan el esqueleto de indazolilpirazolipiridina (1-ipp).
- Se ha realizado la síntesis y estudio de una batería de ligandos basados en la estructura la 4-aryl-6-indazolil-2pirazolilpiridina con diferente demanda electrónica en el anillo bencénico. El estudio fotofísico de las propiedades de estos ligandos muestra que los ligandos que cuentan con sustituyentes dadores de electrones en posición *para* del anillo bencénico, presentan un desplazamiento batocrómico de los máximos de absorción, por lo que el aporte energético para conseguir su excitación es menor.
- Los ligandos que se muestran en la Figura 6.1, fueron conjugados sobre oligonucleótidos para su aplicación en bioensayos.

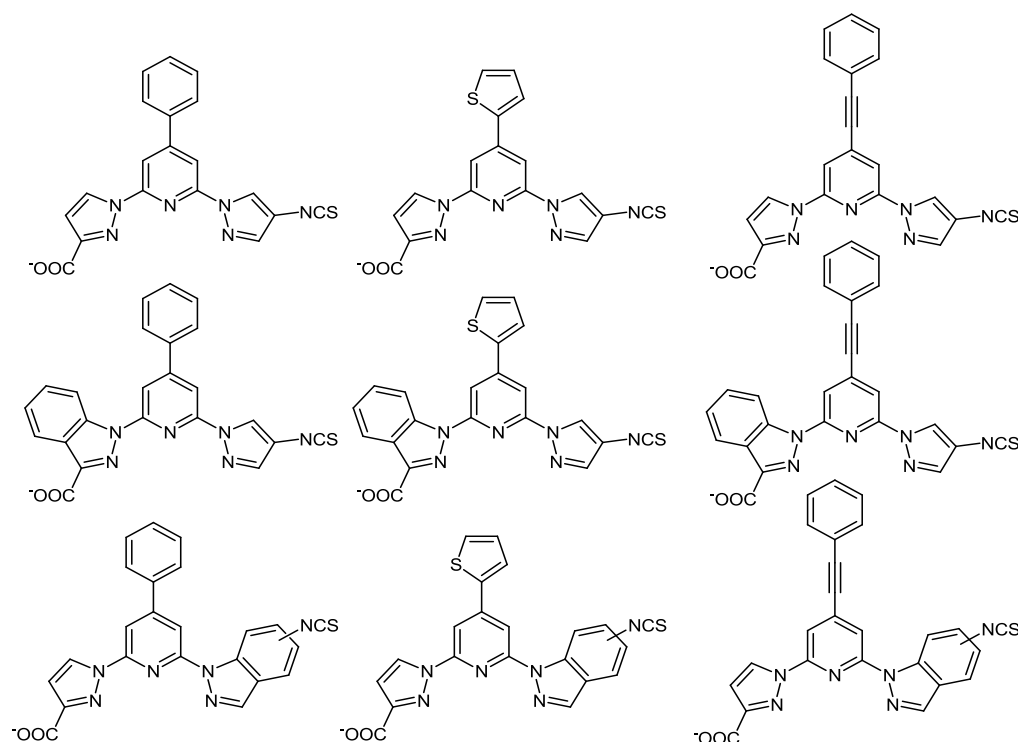


Figura 6.1

Las reacciones de hibridación, entre las sondas marcadas y un ADN diana, se han llevado a cabo obteniéndose resultados positivos tanto para el ion de Europio y Terbio, en la mayoría de casos. Obteniéndose resultados muy prometedores para el complejo formado por el Tb<ICC> y el ligando **16a**.

- A través de la realización de este trabajo se abren numerosas perspectivas para el desarrollo de nuevas familias de ligandos capaces de formar complejos ternarios con iones lantánidos y de tener actividad biológica como detectores de ADN bacteriano.

6.2. Conclusiones del capítulo 4

- Se ha desarrollado un método general que permite la síntesis de dos familias de ligando derivadas del 1-bpp y 1-bip, las cuales forman complejos luminiscentes con iones lantánidos (Eu y Tb), y presentan alta estabilidad en disoluciones acuosas
- El estudio de las propiedades fotofísicas en solución acuosa de los complejos de Eu y Tb de las dos familias de ligandos sintetizadas han confirmado las excelentes propiedades de luminiscencia para los complejos de Tb de **I-a**, sustituido por un anillo benceno también del **I-d** (4'-metoxifenil), que aunque inferiores superan los hasta ahora descrito para este tipo de estructuras y el ligando **I-c** en el que el grupo feniletinilo genera rendimientos cuánticos similares para Europio y Terbio

por lo que se convierte en un excelente candidato para su aplicación como sondas para multiplexado.

- El estudio comparativo de las dos familias de ligandos sintetizadas, con estructuras tipo 1-bpp y 1-bip, siendo los bisindazolil derivados muy inferiores a pesar de sus prometedoras estructuras, lo que permite sentar unas bases estructurales en el diseño de nuevas sondas luminiscentes.

6.3. Conclusiones del capítulo 5

- Se ha desarrollado una metodología sintética para la obtención de ligandos derivados de la 1-bpp y 1-bip con tres o cuatro grupos ácidos en su estructura, los cuales pueden ser utilizados como unidades estructurales en arquitectura molecular.
- Las buenas propiedades de complejación de iones metálicos hacen de estos ligandos candidatos perfectos para la síntesis de materiales híbridos, ligando orgánico-ion metálico. Al elegir como metal, iones de Europio y Terbio estos materiales híbridos presentan buenas propiedades luminiscentes.
- Los ligandos derivados del 1-bpp que presentan tres grupos ácidos conducen a la formación de hidrogeles, en un amplio rango de pH. Estos geles son producto de interacciones intermoleculares como enlaces de Hidrogeno y apilamiento $\pi\pi$. Se han realizado estudios preliminares de estos geles mediante microscopía electrónica de barrido. Las múltiples aplicaciones que pueden tener estos geles abren una nueva vía de estudio para sentar unas bases capaces de explicar y predecir la formación de estos hidrogeles.
- Se ha abordado la preparación de materiales híbridos (Ln-MOFs) utilizando iones de Europio con los ligandos **27-3** y **27-4**, utilizando métodos hidrotermales.
- Los materiales sintetizados a partir del ligando **30** con los iones de Europio y Terbio, muestran mayor cristalinidad, y buenas propiedades fotofísicas, por lo que constituyen un punto de partida interesante para la síntesis de este tipo de materiales.

7. Parte experimental

7.1. Materiales y métodos

Disolventes y reactivos

Todos los disolventes anhidros se secan mediante el uso de un tamiz molecular adecuado, activado en el microondas durante 1 minuto a máxima potencia (2 veces) y secado posteriormente en la línea.¹⁵¹

La mayoría de los reactivos empleados son productos comerciales suministrados por Aldrich, Fluka o Acros, a excepción del 3-etoxicarbonilpirazol,¹⁵² 4-bromo-2,6-difluorpiridina¹⁵³ y 3-metoxicarbonilindazol,¹⁵⁴ que se sintetizan según la bibliografía.

Los compuestos orgánicos usados para los ensayos de hibridación son productos sintetizados en el laboratorio. Los oligonucleótidos son productos comerciales suministrados por ThermoFisher Scientific y Biomers. La disolución Delfia Enhancement Solution (DES) es suministrada por Perkin-Elmer y las columnas NAP-5 son de GE Healthcare.

Todos los materiales y disoluciones empleados para el anclaje e hibridación deben ser estériles y manejados en las condiciones más asépticas posibles.

Microondas

Microondas Biotage Initiator

Cromatografía

El seguimiento de las reacciones se efectúa por cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios de gel de sílice de 0.2 mm de espesor (Marchery-Nagel). Las cromatografías se realizan en el Cromatógrafo Biotage Isolera One y el eluyente se indica en cada caso, estando las proporciones relativas de disolventes en volumen/volumen.

Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN se realizan en los equipos Bruker AV-300 y Bruker AVII-300 a temperatura ambiente. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en

151 D.D. Perrin, D.R. Perrin, Purification of Laboratory Chemicals, Ed. Pergamon Press, 2ª Edición, **1989**.

152 H. Reimlinger, Liebigs Ann. Chem., **1959**, 625, 970.

153 D. R. Cefalo, J. I. Henderson, H. H. Mokri (Frontier Scient. Inc.; Logan, UT), US-A 7087755, **2006**.

154 K.W. Wood, J.P. Fisher, A. Clairborne, T. Li. S.A. Thomas, G-D. Zhu. R.B. Diebold, X. Liu. Y. Shi. V. Klinghofer, E.K. Han, R. Guan, S.R. Magnone, E.F. Johnson, J.J. Bouska, A. Olson, R. de Jon, T. Oltersdorf, Y. Luo, S.H. Rosenberg. V.L. Giranda, Bioorg. Med. Chem., **2006**, 14, 6832.

ppm relativas a la señal del tetrametilsilano (TMS), que se utiliza como referencia en ^1H -RMN, o la señal del cloroformo deuterado a 77.0 ppm en ^{13}C -RMN.

Espectrometría de Masas

Los espectros de masas de impacto electrónico y FAB de bombardeo con cationes cesio acelerados (L-SIMS) se registran en un espectrómetro VG AutoSpec, en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI, UAM), empleando como matriz alcohol m-nitrobencílico. Las muestras analizadas por MALDI-TOF se realizan por un espectrómetro Bruker Ultraflex III con láser de nitrógeno, empleando como matriz ácido dihidroxibenzóico o α -cianocinámico. Los datos obtenidos (m/z) se expresan en unidades de masa atómica (uma) y los valores entre paréntesis corresponden a las intensidades relativas al pico base.

Análisis Químico Elemental

Los análisis elementales se realizan con un analizador elemental LECO CHNS-932 en el SIdI, UAM. Los datos vienen expresados en tanto por ciento.

Espectroscopia electrónica

Los espectros de absorción se realizan en un espectrofotómetro JASCO V-660 Spectrophotometer y los de luminiscencia en espectrofluorímetros Perkin Elmer LS-50 y Varian Cary Eclipse.

Medidas por espectrofotometría de absorción y de emisión

Se preparan disoluciones de los ligandos sintetizados en concentraciones del orden de 10^{-3} M. A partir de esta concentración inicial, se preparan otras disoluciones comprendidas entre 10^{-5} y 10^{-7} M para la determinación de los coeficientes de absorción molar (ϵ).

Los espectros de luminiscencia de los complejos de lantánidos se registran en el modo fosforescencia del equipo, con una velocidad de barrido de 250 nm/min, y con las ventanas de emisión y de excitación ajustadas a 5 nm para los complejos de Europio y Terbio; utilizando un tiempo de retardo de 0.1 ms y un tiempo de integración variable entre 1 y 5 ms.

7.2. Procedimientos generales

a. Reacción de acoplamiento Sonogashira

Bajo atmósfera de argón se añaden el derivado bromado (1 equivalente), dicloro-bis-trifenilfosfina de paladio (0.06 equivalentes), ioduro de cobre (0.06 equivalentes), THF seco (8.5 mL), trietilamina (2.5 mL) y el alquino correspondiente (1.2 equivalentes). Se calienta a reflujo de THF (70-80°C) durante 24h días. Se añade cloruro de metileno (20 mL) y se lava con agua (2 x 15 mL). El producto se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (utilizando como eluyentes una mezcla hexano/diclorometano en un gradiente de 1:1-0:1).

b. Reacción de acoplamiento Sonogashira por radiación microondas

En un reactor de microondas equipado con el imán y bajo atmósfera de argón se añaden el derivado bromado (1 equivalente), dicloro-bis-trifenilfosfina de paladio (0.061 equivalentes), ioduro de cobre (0.061 equivalentes), THF (3.5 mL), trietilamina (1.5 mL) y el alquino correspondiente (1.2 equivalentes). La reacción se irradia durante 13 minutos a una temperatura de 130°C. Se añade cloruro de metileno (20 mL) y se lava con agua (2 x 15 mL). El producto se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (utilizando como eluyentes una mezcla hexano/diclorometano en un gradiente de 1:1-0:1).

c. Reacción de acoplamiento Suzuki-Miyaura

El derivado bromado (1 equivalente), el correspondiente ácido borónico (1.5 equivalentes) y la tetrakis-trifenilfosfina (0.05 equivalentes) se mezcla en un tubo de microondas equipado con imán y bajo atmósfera de argón. Se añade THF seco (10 mL) y el volumen correspondiente de una disolución de hidróxido potásico acuoso 1M (2.2 equivalentes). La disolución inicialmente se agita 2 minutos y luego se calienta 11 minutos a 130°C. Se elimina el disolvente, se añade agua (10 mL) y se extrae con diclorometano. El producto se purifica mediante cromatografía en sílice variando los eluyentes según los productos sintetizados.

d. Hidrólisis de los ésteres metílicos/etílicos pirazólicos o indazólicos en ligandos monosustituidos.

Se disuelve el producto esterificado (1 equivalente) en una mezcla de etanol (2.6 mL), e hidróxido sódico (3 equivalentes) y agua (2 mL). La disolución se agita durante 12 h a 35°C. Se elimina el etanol a presión reducida y se neutraliza con ácido clorhídrico al 10%. Se extrae con éter etílico (2 x 2.6 mL) y se elimina el disolvente.

e. Reducción de los grupos ésteres metílicos/etílicos pirazólicos o indazólicos a grupos hidroxilo.

A una disolución del derivado 3-etoxicarbonilpirazol (1 equivalente) en THF seco (10 mL) a -78°C , se añade gota a gota la solución de LiAlH_4 1.0 M (2 equivalente). La disolución se mantiene bajo agitación durante 90 minutos y se deja alcanzar temperatura ambiente progresivamente. La reacción se trata mediante la adición sucesiva de agua (50 μL), NaOH al 15% (50 μL) y agua (150 μL). Después de la filtración de las sales de litio, el disolvente es evaporado.

f. Sustitución de los grupos hidroxilo por átomos de bromo.

El alcohol correspondiente (1 equivalente) se disuelve en acetonitrilo (10 mL). El tribromuro de fósforo (0.6 equivalentes) se añade a la mezcla y se calienta a reflujo durante 90 minutos. El disolvente se elimina, se añade una disolución acuosa saturada de carbonato sódico (10 mL), se extrae con diclorometano y se elimina el disolvente.

g. Sustitución de los átomos de bromo por restos de iminodiacetato de tert-butilo.

A una disolución del derivado bromado (1 equivalente) en acetonitrilo seco (20 mL) se añade carbonato sódico (8 equivalentes) y el iminodiacetato de tert-butilo (2 equivalente). La mezcla se agita a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón durante 24 horas. El disolvente se elimina, el precipitado obtenido se lava con agua y se extrae con diclorometano.

h. Transformación de los grupos éster tert-butílicos en ácidos carboxílicos.

A una disolución del éster tert-butílico correspondiente en diclorometano se añade ácido trifluoracético y se agita a temperatura ambiente durante 18 horas. Una vez eliminado el disolvente, el producto precipita al añadir éter etílico.

i. Transformación del grupo amino en grupo isotiocianato.

A una disolución del amino correspondiente (1 equivalente) y bicarbonato sódico (6 equivalentes) en mezcla de agua (20 mL) y cloroformo (20 mL), se añade tiofosgeno (4.4 equivalentes) y se agita vigorosamente durante 3 horas. El precipitado formado se aísla por centrifugación y se lava con agua.

j. Reacción de acoplamiento Suzuki-Miyaura e hidrólisis simultánea.

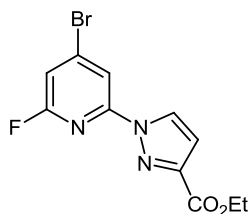
El derivado bromado (1 equivalente), el ácido borónico correspondiente (1.1 equivalentes), la tetrakis(trifenil)fosfina de paladio (0.05 equivalentes) e hidróxido

potásico 2M (2.7 equivalentes) se ponen en un tubo de microondas equipado con imán y bajo atmósfera de argón. Se añade DMF seca y destilada (3 mL). La disolución inicialmente se agita 2 minutos y luego se calienta 45 minutos a 150°C. Se añade agua y el producto precipita; en el caso de que no se produzca esta precipitación se adiciona ácido clorhídrico concentrado hasta que esto ocurra. El producto se aísla mediante centrifugación.

7.3. Síntesis de los ligandos

Síntesis de 4-bromo-2-(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)-6-fluoropiridina (1)

Se disuelve el 3-etoxicarbonilpirazol (2g, 14.26 mmol) en THF (10 mL), en atmosfera inerte. Se enfría a 0°C y se le añade la cantidad estequiométrica de NaH (60%). La suspensión de la sal de pirazol se canula a otra disolución de 4-Bromo-2,6-difloropiridina (2,77 g, 14,28 mmol) en THF (10 mL). Se agita manteniendo la temperatura a 0°C durante dos horas. Transcurrida la reacción, se elimina el disolvente, se lava con agua y se extrae con diclorometano. La fase orgánica se seca y se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM: Hexano 1:1). Se obtiene 1 un sólido blanco (1,86 g, 83%).



¹H-RMN (CDCl₃, 300MHz) δ : 8.45 (1H, d, $J=2.63$ Hz), 8.21 (1H, s), 7.06 (1H, s_a), 6.95 (1H, d, $J=2.63$ Hz), 4.44 (2H, c, $J=7.23$ Hz), 1.42 (3H, t, $J=7.24$ Hz) ppm.

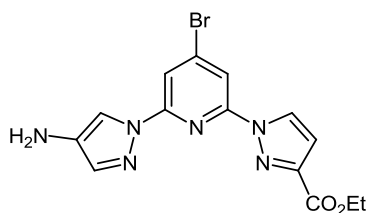
¹³C-RMN (CDCl₃, 75MHz) δ : 163.72, (161.68, 160.46), 147.01, 137.93, 129.03, 113.42, 111.00, 110.71, 61.79, 14.31 ppm

Análisis Elemental %: C 42.06, H 2.89, N 13.38 (teórico); C 42.43, H 3.16, N 13.18 (experimental)

E.M. (FB⁺): m/z = 314.0 ([M]⁺, 100%), 316 ([M]⁺, 100%).

Síntesis de 4-Bromo-2-(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)-6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (3).

A una disolución de 4-bromo-2-(3-metoxicarbonil-1H-pirazolil)-6-fluoropiridina (0.46 mmol), 4-aminopirazol (0.5 mmol) en 8 mL de DMF, a 0°C en atmosfera inerte, se le adiciona hidruro sódico (0.6 mmol). Transcurridos unos minutos se calienta a 40°C y se agita durante 12 horas. Se le adicionan 15mL de agua. La disolución se centrifuga y se obtiene un sólido, que se lava con agua y con éter etílico repetidas veces. Se obtiene 0.2 mmoles. (Rto:42%)



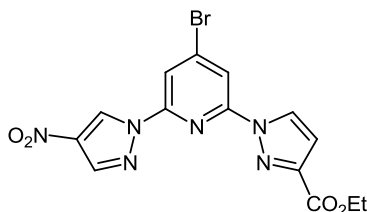
^1H -RMN (CDCl_3 300MHz) δ : 8.51 (1H, d, $J=2.27$ Hz), 8.09 (1H, s), 8.00 (1H, s), 7.43 (1H, s), 6.98 (1H, s), 4.45 (2H, c, $J=7.18$ Hz), 1.43 (3H, t, $J=7.18$ Hz)

^{13}C -RMN (CDCl_3 75MHz) δ : 161.86, 150.58, 149.6, 146.57, 141.66, 136.55, 136.15, 128.47, 113.46, 113.03, 112.26, 110.41, 61.44, 14.32 ppm.

Masas (FB $^+$): (M $^+$) 376.0 (100%)

Síntesis de 4-Bromo-2-(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)-6-(4-nitro-1H-pirazolil) piridina (4)

A una disolución de 4-bromo-2-(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)-6-fluoropiridina (1 mmol), 4-nitropirazol (1 mmol) en THF, a 0°C en atmosfera inerte, se le adiciona hidruro sódico (1,2 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Se elimina el disolvente y el sólido se lava con agua y con hexano caliente, obteniéndose 0.9 mmoles del producto deseado (Rto:90%).



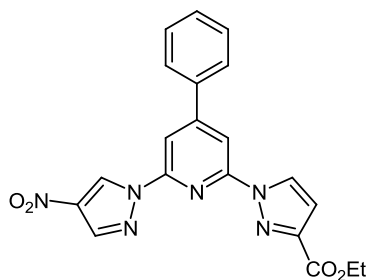
^1H -RMN (CDCl_3 300MHz) δ : 9.19 (1H, s), 8.56 (1H, d, $J=2.63$ Hz), 8.38 (1H, d, $J=1.32$ Hz), 8.30 (1H, s), 8.16 (1H, d, $J=1.32$ Hz), 7.04 (1H, d, $J=2.63$ Hz), 4.47 (2H, c, $J=7.24$ Hz), 1.44 (3H, t, $J=7.23$ Hz) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 75MHz) δ : 171.47, 161.39, 149.15, 146.11, 136.09, 135.69, 131.37, 128.01, 113.03, 112.57, 111.81, 109.96, 60.98, 13.87 ppm.

Masas exactas: 406.0034, teórica: 406.0025

Síntesis de 2-(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)-4-fenil-6-(4-nitro-1H-pirazolil) piridina (5a)

Se sintetiza según el procedimiento general descrito para reacciones de suzuki en microondas en la página 192, a partir de **4** (160mg, 0.39mmol) y 0,43 mmol del ácido fenilborónico. Se purifica en columna cromatográfica de gel de sílice en gradiente CH_2Cl_2 /Hexano (50-100%). Obteniéndose un 95 mg de **5a** (60%).



^1H -RMN (CDCl_3 300MHz) δ : 9.27(1H, s), 8.64(1H, d, $J=2.63$ Hz), 8.40 (1H, d, $J=1.54$ Hz), 8.31(1H, s), 8.22 (1H, d, $J=1.33$ Hz), 7.84-7.81 (2H, m), 7.55-7.53 (3H, m), 7.05 (1H, d, $J=2.62$ Hz), 2.47 (2H, c, $J=7.02$ Hz), 1.45 (3H, t, $J=7.20$ Hz) ppm.

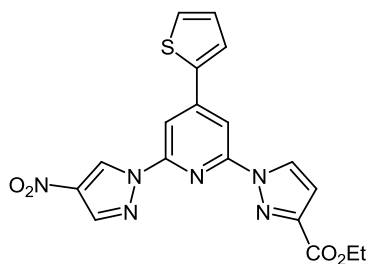
^{13}C -RMN (CDCl_3 75MHz) δ : 161.90, 155.52, 150.33, 149.05, 146.78, 137.56, 136.44, 130.45, 129.35 (x2C), 128.73, 127.39 (x2C), 125.97, 110.74, 110.27, 109.09, 61.53, 14.36 ppm.

Masas Exactas: 404.1243 teórica: 404.1233.

Masas M+H exp: 405.1 (100%), 406.1 (23%), 407.2 (6%); teórica: 405.1 (100%), 406.1 (25%), 407.1 (4%)

2-(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)-4-tienil-6-(4-nitro-1H-pirazolil) piridina. (5b)

Se sintetiza según el procedimiento general descrito para reacciones de suzuki en microondas descrito en la página 192, a partir de 200mg (0,49 mmol) de **4**. El producto se purifica en columna cromatográfica de gel de sílice en gradiente CH_2Cl_2 /Hexano (20-100%), obteniendose 107mg de **5b** (Rto 53%)



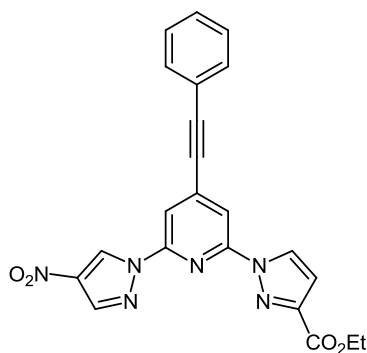
^1H -RMN (CDCl_3 , 300MHz) δ : 9.24 (1H,s), 8.63 (1H, d, $J=2.63$ Hz) , 8.33-8.31(2H, m), 8.16 (1H,s), 7.78 (1H, d, $J=3.40$ Hz) 7.55 (1H, d, $J=5.20$), 7.21(1H, t, $J= 4.90$ Hz), 7.05 (1H, d, $J=2.64$ Hz),6.48 (2H, c, $J=7.16$ Hz), 1.46 (3H, t, $J=7.15$ Hz) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75MHz) δ : 161.5, 149.8, 148.8, 147.8, 146.3, 139.2, 137.1, 128.7, 128.3, 128.2, 127.1, 1263, 110.2, 107.7, 106.8, 60.9, 14.0 ppm.

Masas M+H exp: 411.1 (100%).

Síntesis de 2-(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)-4-feniletinil-6-(4-nitro-1H-pirazolil) piridina (5c).

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 192 para reacciones de sonogashira a reflujo, a partir de 150mg (0.36 mmol) de **4** y 0.39 mmol de feniletinilo. Se purifica en columna cromatográfica de gel de sílice en gradiente CH₂Cl₂/Hexano (20-100%). Se obtienen 120mg del producto **5c**, con un 80% de rendimiento.

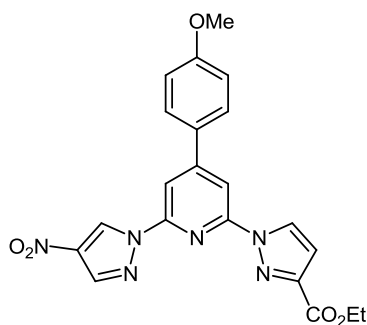


¹H-RMN (CDCl₃, 300MHz) δ: 9.19 (1H, s), 8.57(1H, d, *J*=2.63Hz), 8.27 (1H, s), 8.23 (1H, s), 8.00 (1H, s), 7.58-7.54 (2H, m), 7.43-7.37 (3H, m), 7.01 (1H, d, *J*=2.64Hz), 4.45 (2H, c, *J*=7.02Hz), 1.44 (3H, t, *J*=7.01Hz)ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75MHz) δ: 162.0, 151.3, 149.4, 136.5, 135.1, 134.9, 133.5, 132.1 (2C), 132.1, 129.5, 128.4 (2C), 128.2, 121.8, 113.7, 111.8, 110.9, 110.2, 95.3, 86.4, 61.0, 14.4 ppm.

Síntesis de 2-(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)-4-(fenil-p-metoxi)-6-(4-nitro-1H-pirazolil) piridina. (5d)

Se sintetiza según el procedimiento general para reacciones de Suzuki en microondas descrito en la página 192, a partir de 150mg (0.36mmol) y 0.4mmol del ácido p-metoxifenilborónico. Se obtienen 78mg del producto **5d** (Rdto: 48%).



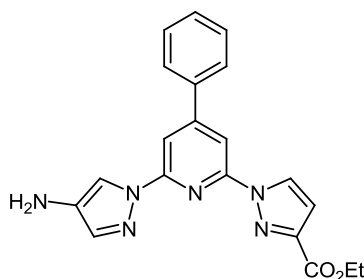
¹H-RMN (CDCl₃ 300MHz) δ: 9.26 (1H, s), 8.63 (1H, d, *J*=2.69 Hz), 8.35 (1H, d, *J*=1,25 Hz), 8.31 (1H, s), 8.18 (1H, d, *J*=1.32 Hz), 7.80 (2H, d, *J*=8.86 Hz), 7.05 (2H, d, *J*=8.86 Hz), 7.04 (1H, d, *J*= 2,69 Hz), 4,47 (2H, c, *J*=7.10Hz), 3.89 (3H, s), 1.45 (3H, t, *J*=7.10 Hz) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75MHz) δ: 161.44, 161.16, 155.32, 154.36, 149.84, 148.55, 136.98, 131.30, 128.28, 128.20, 128.08, 125.45, 114.24, 110.15, 108.92, 107.78, 61.00, 55.02, 13.87 ppm.

Masas M+H exp: 435.1 (100%).

Síntesis de 2-(3-etoxicarbonil-1*H*-pirazolil)-4-fenil-6-(4-amino-1*H*-pirazolil) piridina (6a).

Se disuelve 90mg de **5a** en metanol. Se añade paladio sobre carbón (10%) y se borbotea H₂ durante unos minutos. Entonces se deja en atmosfera de Hidrogeno durante 1 hora. Se filtra sobre celita obteniéndose 77mg de **6a** (Rto 88%).



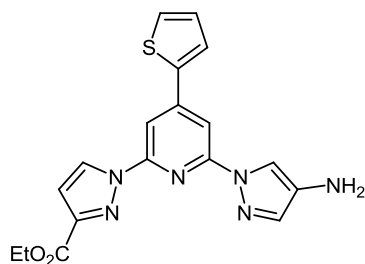
¹H-RMN (CDCl₃ 300MHz) δ: 8.54 (1H, d, *J*=2.63 Hz), 8.23 (1H, s), 7.74-7.71 (2H, m), 7.52-7.50(3H, m), 7.80(1H, s), 6.97 (1H,d, *J*=2.46 Hz), 4.45 (2H, c, *J*=7.2 Hz), 1.43(3H, t, *J*=7.23 Hz)ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃,75MHz) δ: 161.1, 152.5 151.2, 149.8, 140.3, 136.7, 133.7, 131.4, 129.2, 128.7, 127.4, 124.9, 122.8, 110.6, 110.2, 109.3, 60.9, 14.1 ppm.

Masas M+Na exp: 397.2 (100%).

Síntesis de 2-(3-etoxicarbonil-1*H*-pirazolil)-4-tienil-6-(4-amino-1*H*-pirazolil) piridina (6b).

Se disuelve el **5b** en metanol. Se añade paladio sobre carbón (10%) y se borbotea H₂ durante unos minutos. Entonces se deja en atmosfera de Hidrogeno durante 1 hora. Se filtra sobre celita obteniéndose **6b** (Rto 70%).

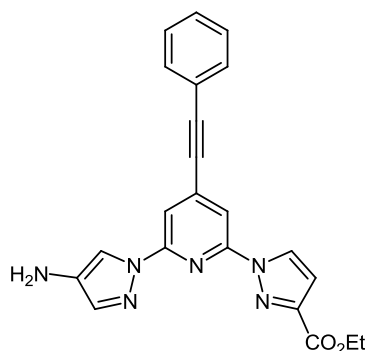


¹H-RMN (CDCl₃ 300MHz) δ: 8.55 (1H, d, *J*=2.42 Hz), 8.22 (1H, s), 7.98(1H, s), 7.88-7.87 (2H, m), 7.67 (1H, d, *J*= 3.98 Hz), 7.45 (1H,d, *J*=4.80 Hz), 7.15 (1H, t, *J*=4.84 Hz), 6.96 (1H,d, *J*=2.42 Hz), 4.45 (2H, c, *J*=6.82Hz), 1.43 (3H, t, *J*=7.04)ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75MHz) δ: 161.3, 153.2, 151.4, 150.2, 140.8, 139.3, 135.0, 134.4, 132.7, 128.3, 125.2, 117.1, 116.9, 112.7, 110.2, 109.4, 61.1, 14.2 ppm.

2-(3-etoxicarbonil-1*H*-pirazolil)-4-feniletinil-6-(4-amino-1*H*-pirazolil) piridina (7).

Se disuelven 70mg **5d** en una disolución de cloruro amónico en etanol (0.5M) y se añade cloruro de estaño dihidratado (15eq.). La reacción se mantiene a 60°C durante 12 horas. Se ajusta el pH de la mezcla resultante con NaHCO₃ hasta pH=11 y se filtra sobre Celita. La fase acuosa se extrae con acetato de etilo. Se seca sobre sulfato sódico y se elimina el disolvente a presión reducida. Se obtienen 40 mg del producto **7** (Rto 61%).



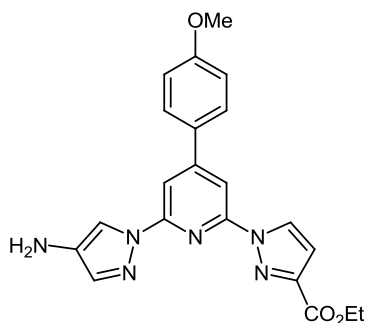
¹H-RMN (CDCl₃, 300MHz) δ: 8.54 (1H, d, *J*=2.52 Hz), 8.03 (1H, s), 8.01 (1H, s), 7.90 (1H, s), 7.56-7.53 (2H, m), 7.44 (1H, s), 7.40-7.36 (3H, m), 6.98 (1H, d, *J*=2.52 Hz), 4.45 (2H, c, *J*=7.12 Hz), 1.43 (3H, t, *J*=7.13 Hz) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75MHz) δ: 162.06, 150.37, 149.42, 146.29, 136.59, 135.80, 132.12 (2C), 132.08, 129.50, 128.56 (2C), 128.36, 121.83, 113.70, 111.79, 110.99, 110.26, 95.35, 86.37, 61.40, 14.39 ppm.

Masas (M+H) exp: 399.1 (100%), 400.1, 401.0

2-(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)-4-(fenil-*p*-metoxi)-6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (6d).

Se disuelve 70mg de **5d** en metanol. Se añade paladio sobre carbón (10%) y se borbotea H₂ durante unos minutos. Transcurrida una hora en atmosfera de Hidrogeno, la reacción se filtra sobre celita y se obtienen 65mg de **6d** como un sólido blanco. (Rto 93%)

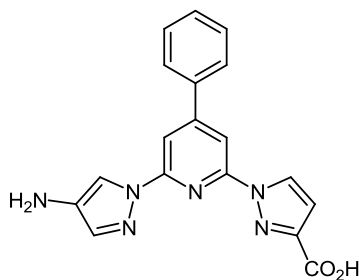


¹H-RMN (CDCl₃, 300MHz) δ : 8.57 (1H, d, $J=2.53$ Hz), 8.30 (1H, s), 8.26 (1H, s), 8.01 (1H, s), 7.91 (2H, d, $J=8.68$ Hz), 7.53 (1H, s), 7.13 (2H, d, $J=8.84$ Hz), 6.98 (1H, d, $J=2.53$ Hz), 4.44 (2H, c, $J=7.2$ Hz), 3.90 (3H, s), 1.45 (3H, t, $J=7.15$) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75MHz) δ : 161.6, 160.9, 153.6, 149.84, 148.55, 140.4, 136.2, 131.3, 130.3, 128.20, 120.1, 119.8, 119.6, 110.15, 108.9, 61.2, 55.5, 14.0 ppm.

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-pirazolil)-4-fenil-6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (8a).

Se sintetiza según el procedimiento general para las hidrolisis de grupos ésteres descrito en la página 192 a partir de **6a** (0,19 mmol). Se obtienen 67mg **8a** como un sólido blanco (90%).



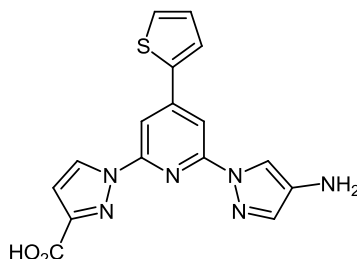
¹H-RMN (MeOd₄, 300MHz) δ : 8.66 (1H, d, $J=2.41$ Hz), 8.11 (1H, s), 8.02 (1H, s), 7.95-7.90 (3H, m), 7.58-7.55 (3H, m), 7.44 (1H, s), 6.69 (1H, d, $J=2.63$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (MeOd₄, 75MHz) δ : 167.7, 153.6, 151.9, 150.8, 140.2, 138.2, 134.3, 132.1, 130.4, 129.0, 127.3, 126.9, 120.5, 118.8, 112.9, 109.5 ppm.

Maldi [M+Na]⁺=397.1

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-pirazolil)-4-tienil-6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (8b).

Se sintetiza según el procedimiento general para las hidrolisis descrito en la página 192 a partir de **6b** (0.60mg, 0.16 mmol). Se obtiene 44mg de **8b** (Rto 80%).

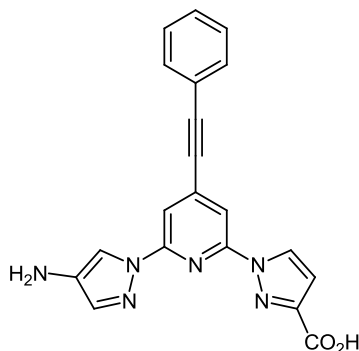


¹H-RMN (MeOd₄, 300MHz) δ: 8.56 (1H, s, *J*=2.54 Hz), 8.20 (1H, s), 7.95 (1H, s), 7.84 (2H, m), 7.63 (1H, d, *J*= 4.52Hz), 7.45 (1H, d, *J*=4.6 Hz), 7.22 (1H, t, *J*=3.86 Hz), 6.89 (1H, d, *J*=2.83 Hz)ppm.

¹³C-RMN (MeOd₄, 75MHz) δ: 165.3, 154.0, 152.4, 147.2, 141.8, 139.2, 135.5, 134.4, 132.0, 129.6, 125.2, 116.9, 116.8, 113.1, 110.7, 110.2 ppm.

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-pirazolil)-4-feniletinil-6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (8c).

Se sintetiza según el procedimiento general para las hidrolisis descrito en la página 192 a partir 40 mg del producto **7** (0,1 mmol). Se obtienen 31mg de **8c** (Rto. 84%).



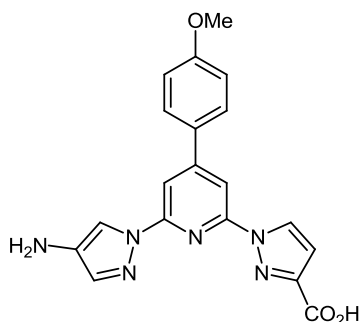
¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 9.07 (1H,s),8.99 (1H,d,*J*=2.62 Hz),8.01 (1H,s),7.96(1H,s), 7.94 (1H,s)7.53-7.46 (3H,m), 7.73-7.68 (2H,m), 7.03 (1H, d, *J*=2.69 Hz)ppm.

¹³C-RMN (DMSO, 75MHz) δ: 166.5, 155.7, 155.2, 146.1, 134.5, 132.8, 132.6 (2C), 131.8, 129.5, 128.6, 128.3, 122.8, 121.7, 121.1, 115.9, 114.6, 90.5, 86.7 ppm.

Masas (ESI+) [M+H] exp: 371.13 (100%), 372.13 (15%) teórica: 371.1 (100%), 372.1 (24%), 373.1 (3%).

Síntesis de 2-(3-carbonil-1H-pirazolil)-4-(fenil-*p*-metoxi)-6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (8d).

Se sintetiza según el procedimiento general para las hidrolisis descrito en la página 192 a partir de **6d** (0,11 mmol). Se obtiene **8d** como un sólido blanco (29 mg, 73%).

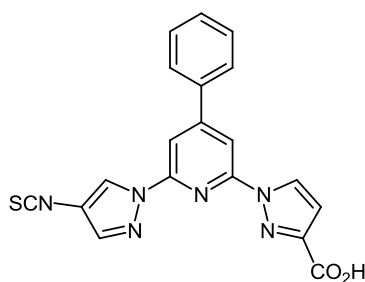


¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 8.69 (1H, d, *J*=2.63 Hz), 8.29 (1H, s), 8.27 (1H, s), 8.01 (1H, s), 7.91 (2H, d, *J*=8.67 Hz), 7.52 (1H, s), 7.13 (2H, d, *J*= 9.04 Hz), 6.92 (1H, d, *J*=2.62 Hz), 3.90 (3H, s) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75MHz) δ: 164.9, 160.1, 152.6, 150.1, 147.7, 145.9, 140.2, 131.2, 130.5, 121.20, 120.9, 119.8, 119.6, 112.1, 110.9, 55.4 ppm.

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-pirazolil)-4-fenil-6-(4-isotiocianato-1H-pirazolil) piridina (9a).

Se sintetiza según el procedimiento general para la transformación del grupo amino en grupo isotiocinato descrito en la página 193 a partir de 65mg de **8a**. Se obtiene **9a** (40 mg, 0,1mmoles). Rendimiento de 59%.



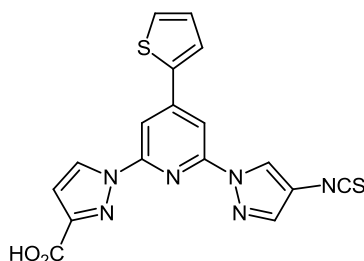
¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 9.45 (1H, s), 9.14 (1H, d, *J*=2.42 Hz), 8.22 (1H, s), 8.10 (1H, s), 8.09 (1H, s), 7.93-7.90 (2H, m), 7.61-7.56 (3H, m), 7.06 (1H, d, *J*=2.64 Hz) ppm.

M/z = 388.1

I.R. (KBr) (ν cm⁻¹): 2137 (S=C=N), 1615 (C=O), 1401 (C-O).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-pirazolil)-4-tienil-6-(4-isotiocianato-1H-pirazolil) piridina (9b)

Se sintetiza según el procedimiento general para la transformación del grupo amino en grupo isotiocinato descrito en la pág. 193 a partir de **8b** (0,34 mmol). Se obtiene **9b** (Rto=83%).



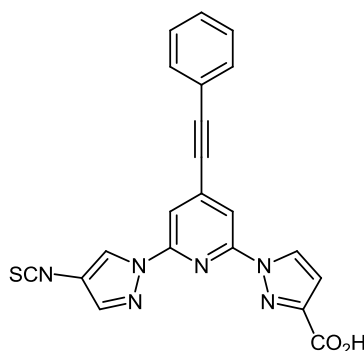
¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 9.40 (1H, s), 8.86 (1H, d, *J*=2.53 Hz), 8.21 (1H, s), 8.08 (1H, s), 8.06 (1H, d, *J*=4.24 Hz), 7.93 (1H, s), 7.88 (1H, d, *J*=5.11 Hz), 7.30 (1H, t, *J*=4.46 Hz), 6.67 (1H, d, *J*=2.09 Hz)ppm.

MS Maldi (M+Na) 417.1 (100%), 418.1 (21%), 419.1 (17%) Teórico, 417.0 (100%), 418.0 (22%) 419.0 (12%)

I.R. (KBr) (ν cm^{-1}) : 2135 (S=C=N), 1605 (C=O), 1412 (C-O).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-pirazolil)-4-feniletinil-6-(4-isotiocianato-1H-pirazolil) piridina (9c).

Se sintetiza según el procedimiento general para la transformación del grupo amino en grupo isotiocinato descrito en la pág. 193 a partir de **8a** (0,34 mmol). Se obtiene **9a** (Rto=78%).



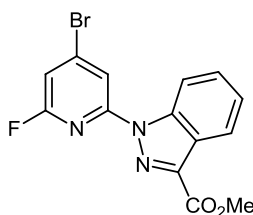
¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 9.44 (1H, s), 9.12 (1H, d, *J*=2.43 Hz), 8.21 (1H, s), 7.94 (1H, s), 7.90 (1H, s), 7.75-7.70 (2H, m), 7.57-7.42 (3H, m), 7.04 (1H, d, *J*=2.47 Hz) ppm.

Masas (ESI⁺): 435.07 [(M+Na)⁺ 100%].

I.R. (KBr) (ν cm⁻¹) : 2140 (S=C=N), 1605 (C=O), 1411 (C-O).

Síntesis de 4-bromo-2-(3-metoxycarbonil-1H-indazolil)-6-fluoropiridina (10).

En un matraz se disuelven 9 mmoles de 3 metoxycarbonilindazol en THF (17mL), en atmosfera inerte. La disolución se enfría a 0°C y se añade hidruro sódico (9.5mmoles). Se agita 5 minutos y se canula sobre otra disolución de 4-Bromo-2,6-difloropiridina en 10 mL de THF. La agitación se mantiene durante 5h alcanzandose temperatura ambiente. Se elimina el disolvente y el sólido resultante se lava con agua y hexano. Rto 84%



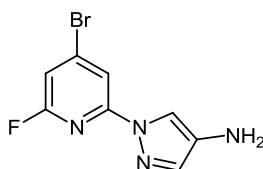
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ : 8.78 (1 H d, J = 8.5 Hz); 8.28-8.26 (2 H, m); 7.60 (1H, t, J = 7.5 Hz); 7.44 (1h, t, J = 7.5 Hz); 7.04 (1H, d, J = 3 Hz); 4.10 (3H, s).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ (ppm) (300 MHz): 163.70; 161.78; 159.75; 157.20; 142.04; 137.20; 131.39; 126.61; 122.90; 121.75; 119.44; 113.98; 108.49; 107.38; 53.00.

E.M. (ESI⁺): m/z = 350 ([M]⁺, 100%), 352 ([M]⁺, 100%).

Síntesis de 2-(4-amino-1H-pirazolil)-4-bromo-6-fluoropiridina

A una disolución del 4-aminopirazol (1 mmol) en THF seco (10 mL) a 0°C, se le añade hidruro sódico (60%, 1.1 mmol). La disolución se mantiene en frío y con agitación durante 15 minutos y se canula sobre una disolución de 4-bromo-2,6-difluoropiridina (1.05 mmol) en THF (10 mL) a 0°C. Se agita 2 horas alcanzando temperatura ambiente. El disolvente se elimina a presión reducida. Se añade bicarbonato sódico, el producto se extrae con diclorometano. Se obtiene puro con un rendimiento del 60%



¹H-RMN (CDCl₃, 300MHz) δ : 7.98 (s, 1 H); 7.97 (s, 1 H), 7.47 (s, 1 H); 6.93 (s, 1 H) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃ 75MHz) δ : 137.13-137.01, 136.30, 131.90, 113.75, 111.67, 111.61, 108.5, 107.99 ppm.

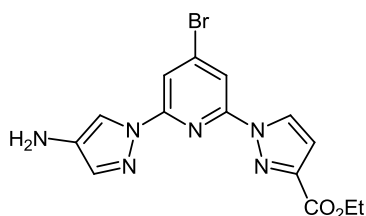
Análisis elemental

Experimental %C: 38.34 %H: 2.44 %N: 21.87

Teórico: %C: 37.38; % H: 2.35; %N: 21.80.

Síntesis de 4-Bromo-2-(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)-6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (12)

A una disolución de 4-bromo-2-(3-metoxicarbonil-1H-pirazolil)-6-fluoropiridina (0.46 mmol), 4-aminopirazol (0.5 mmol) en 8 mL de DMF, a 0°C en atmosfera inerte, se le adiciona hidruro sódico (0.6 mmol). Transcurridos unos minutos se calienta a 40°C y se agita durante 12 horas. Se le adicionan 15mL de agua. La disolución se centrifuga y se obtiene un sólido, que se lava con agua y con éter etílico repetidas veces. Se obtiene 0.2 mmoles. (Rto:42%).



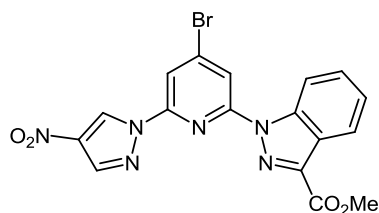
¹H-RMN (CDCl₃ 300MHz) δ: 8.51 (1H, d, *J*=2.27 Hz), 8.09 (1H, s), 8.00 (1H, s), 7.43 (1H, s), 6.98 (1H, s), 4.45 (2H, c, *J*=7.18 Hz), 1.43 (3H, t, *J*=7.18 Hz) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃ 75MHz) δ: 161.9, 150.6, 149.6, 146.6, 141.7, 136.5, 136.1, 128.5, 113.5, 113.0, 112.3, 110.4, 61.4, 14.3 ppm.

Masas (FB+): (M+)376.0(100%)

Síntesis de 4-Bromo-2-(3-metoxicarbonil-1H-indazolil)-6-(4-nitro-1H-pirazolil) piridina (11)

A una disolución de 4-bromo-2-(3-metoxicarbonil-1H-indazolil)-6-fluoropiridina (1 mmol), 4-nitropirazol (1.1 mmol) en 8 mL de DMF, a 0°C en atmosfera inerte, se le adiciona hidruro sódico (1,2 mmol). Transcurridos unos minutos se calienta a 40°C y se agita durante 12 horas. Se le adicionan 15mL de agua. La disolución se centrifuga y se obtiene un sólido, que se lava con agua y con éter etílico repetidas veces.

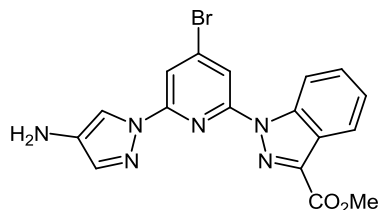


^1H -RMN (CDCl_3 300MHz) δ : 9.19(1H, s), 8.59 (1H, d, $J=8.77\text{Hz}$), 8.43 (1H, s), 8.34 (1H,s), 8.33 (1H, d, $J=8.11\text{Hz}$), 8.16 (1H, s), 7.71 (1H, t, $J=7.24\text{Hz}$), 7.51 (1H, d, $J=7.22\text{Hz}$), 4.12 (3H, s)ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75MHz) δ : 163.2, 155.1, 151.0, 143.8, 138.0, 135.3, 134.9, 133.6, 130.8, 126.4, 123.7, 123.2, 119.9, 116.4, 114.8, 110.3, 51.5 ppm.

Síntesis de 4-Bromo-2-(3-metoxycarbonil-1H-indazolil)-6-(4-amino-1H-pirazolil)piridina (13)

A una disolución de 4-bromo-6-(4-aminopirazol)-2-fluoropiridina (1 mmol), 3-metoxycarbonil-1H-indazol (1.1 mmol) en 8 mL de DMF, a 0°C en atmosfera inerte, se le adiciona hidruro sódico (1,2 mmol). Transcurridos unos minutos se calienta a 40°C y se agita durante 12 horas. Se le adicionan 15mL de agua. La disolución se centrifuga y se obtiene un sólido, que se purifica tras sucesivos lavados con agua y con éter etílico. (Rto 84%)



^1H -RMN (CDCl_3 300MHz) δ : 8,67 (d, 1H, $J=8,66\text{Hz}$); 8,31 (d, 1H, $J=8,22\text{Hz}$); 8,14 (s, 1H); 8,05 (s, 1H); 8,01 (s, 1H); 7,62 (t, 1H, $J=7,29\text{Hz}$); 7,48 (s, 1H); 7,45 (t, 1H, $J=7,34\text{Hz}$); 4,10 (s,3H) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 ,75MHz) δ : 162,54; 152,18; 150,59; 139,99; 138,54; 136,03; 134,32; 131,88; 128,78; 125,04; 124,73; 119,44; 116,90; 113,73; 112,06; 108,28; 52,48 ppm

Maldi m/z $[\text{M}+\text{H}]^+=415$ (100%).

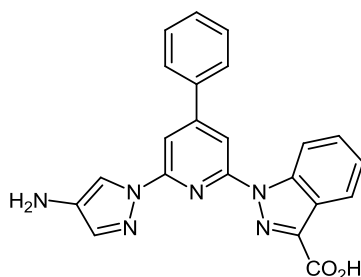
Análisis elemental

Experimental %C: 47.76 %H: 3.16 %N: 19.21

Teórico: %C: 47.35; %H: 3.51; %N: 19.49

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-fenil-6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (15a).

Se sintetiza según el método general para reacciones de microondas e hidrolisis conjuntas descrito en la página 193, a partir de **13** (100 mg, 0.243 mmol) y ácido fenilborónico (34mg, 0.227mmol), DMF seca (2.2 mL) y disolución acuosa de hidróxido potásico 2M. (0,49mL). Se aísla un sólido por centrifugación. Tras sucesivos lavados con cloroformo se aísla **15a**. (Rto: 60%)



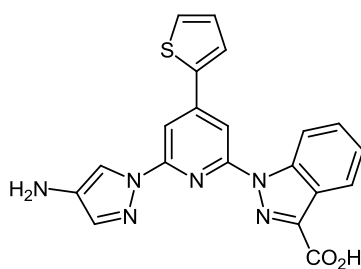
¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 8.79 (1H, d, *J*=8.66 Hz), 8.27 (1H, d, *J*=8.00 Hz), 8.14 (1H, s), 8.07 (1H, s), 7.90-7.95 (m, 2H), 7.79 (1H, s), 7.72 (1H, t, *J*=7.24 Hz), 7.61 (1H, s), 7.57-7.60 (3H, m), 7.53 (1H, t, *J*=7.46 Hz) ppm.

¹³C-RMN (DMSO, 75MHz) δ: 153.7, 152.2, 151.5, 149.7, 139.4, 139.0, 137.5, 136.3, 130.3, 129.5, 129.0, 127.2, 124.7, 124.5, 122.9, 122.1, 117.3, 114.8, 109.2, 106.4 ppm.

MS FB+ (M+1) 397.1 (100%), 398.1 (25%) Teórico: 397.1 (100%), 398.1 (25%).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-tienil- 6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (15b).

Se sintetiza según el método general para reacciones de Suzuki e hidrolisis conjuntas descrito en la página 193, a partir de **13** (100,2 mg , 0,243 mmol) y ácido fenilborónico (34,0mg , 0,227mmol), DMF seca (2,2 mL) y disolución acuosa de hidróxido potásico 2M. (0,49mL). Se aísla un sólido por centrifugación. Tras sucesivos lavados con cloroformo se aísla el **15b**. (Rto: 60%)



¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 8.72 (1H, d, *J*=8.29 Hz), 8.39 (1H, d, *J*=7.91 Hz) 8.32 (1H, d, *J*=1.51 Hz), 8.19 (1H, s), 7.90 (1H, d, *J*=1.13 Hz), 7.85 (1H, d, *J*=3.77 Hz), 7.61 (1H, d, *J*=4.14

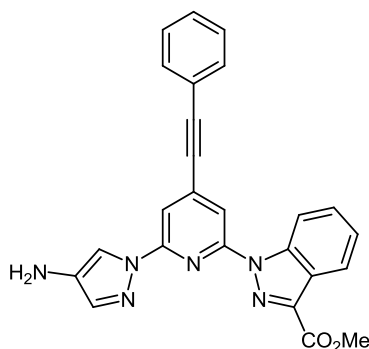
Hz), 7.58 (1H, t, $J=7.16$ Hz), 7.52 (1H, s), 7.36 (1H, t, $J=7.54$ Hz), 7.21 (1H, dd, $J_1=4.90$, $J_2=3.77$ Hz) ppm.

^{13}C -RMN (DMSO, 75MHz) δ : 153.5, 152.2, 151.6, 149.3, 139.7, 139.1, 137.6, 136.4, 130.3, 129.1, 128.9, 128.2, 127.6, 127.1, 122.9, 122.1, 117.32, 114.8, 109.2, 106.4 ppm.

E.M. (MALDI $^+$): $m/z=403$ ($[\text{M}]^+$, 100%).

Síntesis de 2-(3-metoxicarboxil-1H-indazolil)-4-fenilieninil- 6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (14)

Se sintetiza según el método general para reacciones de sonogashira en microondas descrito en la página 192 a partir de **13** (100 mg, 0.243mmol), se obtienen 88mg de **14** (Rto 85%).



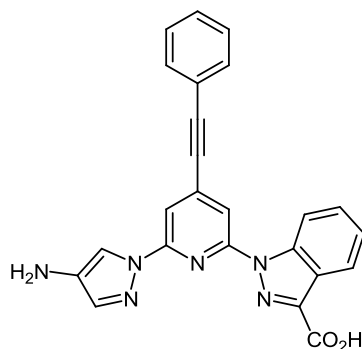
^1H -RMN (CDCl_3 , 300MHz) δ : 8.80 (1H, s), 8.79 (1H, d, $J=9.04$ Hz), 8.27 (1H, d, $J=8.30$ Hz), 8.05 (1H, s), 8.01 (1H, s), 7.95 (1H, s), 7.77 (2H, m), 7.61-7.49 (5H, m), 4.04 (3H, s) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75MHz) δ : 161.7, 154.3, 151.5, 137.2, 134.3, 131.9, 131.7, 129.9, 129.2, 128.6, 126.6, 124.0, 123.0, 120.1, 119.4, 128.9, 114.6, 108.7, 91.1, 90.2, 52.9 ppm.

FB+ MS ($\text{M}+1$): 435.2 (100%), 436.2 (27%), 437.2 (5%), Teórico: 435.2 (100%), 436.2 (30%), 437.2 (5%).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-fenilieninil- 6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (15c).

Se sintetiza según el método general para reacciones de hidrolisis de ésteres descrito en la página 192 se hace reaccionar **14** (87mg), obteniendose 80mg de la sal sódica de **15c** (Rto: 92%).



¹H-RMN (DMSO, 300 MHz) δ: 8.99 (1H, d, *J*=8.60 Hz), 8.37 (1H, d, *J*=7.90 Hz), 8.18 (1H, s), 7.64 (1H, s), 7.62-7.50 (4H, m), 7.47-7.34 (5H, m) ppm.

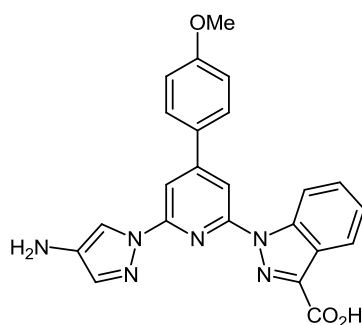
¹³C-RMN (DMSO, 75 MHz) δ: 167.7, 153.3, 151.9, 149.5, 134.7, 131.3, 130.9, 129.0, 128.6, 127.6, 127.25, 124.1, 123.6, 122.4, 121.8, 119.5, 117.7, 116.6, 114.7, 109.3, 90.9, 89.8 ppm.

FB+ (M+Na) 443.2 (100%), 444.2 (21%)

(M-H+2Na): 465.2 (100%), 466.2 (23%), 467.2 (4%)

Síntesis de 2-(3-carboxil-1*H*-indazolil)-4-(*p*-metoxifenil)-6-(4-amino-1*H*-pirazolil)piridina (15d)

Se sintetiza según el método general descrito en la página 193 para reacciones de Suzuki mediante uso de radiación de microondas, a partir de **13** (121 mg, 0.294 mmol) y ácido 4-metoxifenilborónico (48.8mg, 0,236mmol), DMF seca (2.6 mL) y disolución acuosa de hidróxido potásico 2M. (0.6 mL). Tras la adición de HCl (10%), se aísla un sólido por centrifugación. Tras sucesivos lavados con cloroformo se aísla el producto puro. (Rto: 97%)



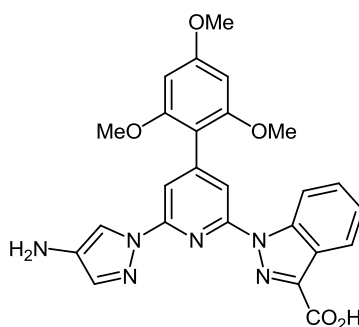
¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 8.97 (1H, s), 8.77 (1H, d, *J*=8.44 Hz), 8.25 (1H, d, *J*=8.12 Hz), 8.17 (1H, s), 8.07 (1H, s), 8.04 (1H, s), 7.92 (1H, d, *J*=8.88 Hz); 7.71 (t, 1H, *J*=7.34Hz), 7.52 (1H, t, *J*=7.51 Hz), 7.14 (1H, d, *J*=8.88 Hz); 3.85 (3H, s) ppm.

¹³C-RMN (DMSO, 75MHz) δ: 152.90, 152.14, 149.58, 146.95, 139.33, 138.85, 137.37, 135.92, 132.03, 131.50, 131.38, 128.46, 124.5, 123.02, 122.66, 121.97, 118.04, 117.39, 114.94, 114.75, 105.35 ppm.

MS FB+ (M+1) 427.1 (100%), 428.2 (22%) Teórico: 427.2 (100%), 428.2 (25%).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-(2,4,6-trimetoxifenil)- 6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (15e).

Se sintetiza según el método general descrito en la página 193 para reacciones de Suzuki e hidrolisis simultanea usando microondas, a partir de **13** (151 mg , 0.366 mmol) y ácido 2,4,6-trimetoxifenilborónico (133mg , 0.475mmol), DMF seca (3.2 mL) y disolución acuosa de hidróxido potásico 2M (0.8mL). Se aísla el sólido por centrifugación. Tras sucesivos lavados con éter se aísla el producto **15e**. (Rto: 67%).



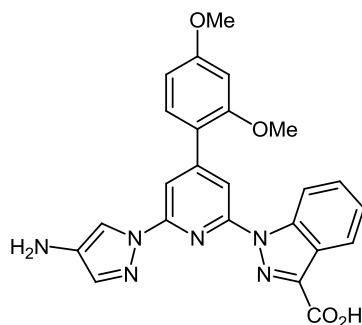
¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 8,87 (s, 1H); 8,75 (d, 1H, J=8,55Hz); 8,10 (d, 1H, J=8,82 Hz); 7,99 (s,1H); 7,70 (1H, t, J=7,34Hz); 7,52 (t, 1H, J=7,62Hz); 7,39 (s, 1H); 7,23 (s, 1H); 6,07 (s, 2H); 3,69 (s, 9H) ppm.

¹³C-RMN (DMSO,75MHz) δ:

MS FB+ (M+1) 487.1 (100%), 488.1 (30%) Teórico: 487.2 (100%), 488.2 (30%)

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-(2,4-dimetoxifenil)- 6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (15f).

Se sintetiza según el método general descrito en la página 193 para reacciones de Suzuki e hidrolisis simultanea usando microondas, a partir de **13** (84.2 mg, 0.204 mmol) y ácido 2,4-metoxifenilborónico (43mg, 0.23mmol), DMF seca (1.8 mL) y disolución acuosa de hidróxido potásico 2M. (0.45mL). Se aísla un sólido por centrifugación. Tras sucesivos lavados con cloroformo se aísla el producto puro **15f**. (Rto: 87%)



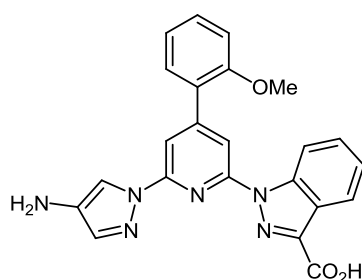
¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 9.00 (1H, s), 8.76 (1H, d, $J=8.61$ Hz), 8.25 (1H, d, $J=8.05$ Hz), 8.07 (1H, s), 8.03 (1H, s), 7.94 (1H, s), 7.71 (1H, t, $J=7.57$ Hz), 7.62 (1H, t, $J=6.96$ Hz), 7.53 (1H, d, $J=6.85$ Hz), 6.76 (1H, s), 6.72 (1H, d, $J=6.31$ Hz), 3.87 (3H, s), 3.85 (3H, s) ppm.

¹³C-RMN (DMSO, 75MHz) δ: 162.32, 157.74, 151.79, 151.53, 148.82, 141.93, 139.37, 138.82, 137.49, 132.07, 131.53, 128.84, 124.48, 123.13, 122.03, 118.25, 116.64, 114.79, 111.48, 108.85, 106.10, 99.14, 55.97, 55.50 ppm.

MS FB+ (M+1) 457.1 (100%), 458.1 (30%) Teórico: 457.2 (100%), 458.2 (30%)

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-(2-metoxifenil)-6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (15g).

Se sintetiza según el método general descrito en la página 193 para reacciones de Suzuki e hidrólisis simultánea usando microondas, a partir de **13** (151 mg, 0.37 mmol) y ácido 2,4,6-trimetoxifenilborónico (63mg, 0.41mmol), DMF seca (3.2 mL) y disolución acuosa de hidróxido potásico 2M (0.81mL). Se aísla un sólido por centrifugación. Tras sucesivos lavados con éter se aísla el producto **15g** puro. (Rto: 89%)



¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 9.00 (1H, s), 8.78 (1H, d, $J=8.60$ Hz), 8.26 (1H, d, $J=8.11$ Hz), 8.09 (1H, s), 8.03 (1H, d, $J=5.64$ Hz), 8.02 (1H, s), 7.72 (1H, t, $J=7.40$ Hz); 7.63-7.48 (3H, m), 7.25 (1H, d, $J=8.06$ Hz), 7.15 (t, 1H, $J=7.40$ Hz), 4.10 (3H, s) ppm.

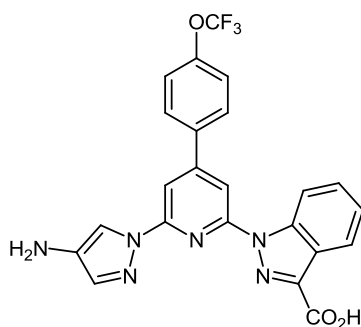
¹³C-RMN (DMSO, 75MHz) δ: 162.80, 156.26, 151.97, 151.52, 148.77, 139.33, 137.57, 133.30, 131.53, 131.40, 130.19, 125.79, 124.61, 124.48, 123.16, 122.02, 121.16, 116.71, 114.79, 112.21, 111.85, 109.18, 55.86 ppm.

MS FB+ (M+1) 427.3 (100%), 428.3 (30%) Teórico: 427.2 (100%), 428.2 (30%)

Masas Exactas (M+H): 427.1531 teóricas: 427.1513

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-(p-trifluorometoxifenil)- 6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (15h)

Se sintetiza según el método general descrito en la pagina 193 para reacciones de Suzuki e hidrolisis simultanea usando microondas, a partir de **13** (74.2mg, 0,17mmol) y ácido 4-trifluorometoxifenilborónico (38.5mg , 0,187mmol), DMF seca (1,7 mL) y disolución acuosa de hidróxido potásico 2M. (0,37 mL). El producto **15h** se aísla un sólido por centrifugación, y se purifica mediante lavados con éter caliente (Rto 79%).



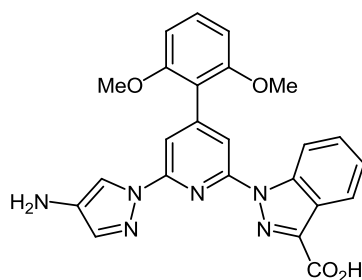
¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 8.98 (1H, s), 8.75 (1H, d, J=8.57Hz), 8.24 (1H, d, J=8.20Hz), 8.19(1H, s), 8.09 (1H, s), 8.07 (2H, d, J=8.29 Hz), 8.05 (1H, s), 7.70 (1H, t, J=7.91Hz), 7.53 (2H, d, J=8.48 Hz), 7.51 (1H, t, J=7.54 Hz) ppm.

¹³C-RMN (DMSO, 75MHz) δ: 152.06, 151.79, 149.56, 149.47, 139.20, 139.02, 137.57, 135.29, 134.1, 131.50, 131.37, 129.26, 128.92, 126.01, 128.8, 124.57, 124.41, 123.12, 121.94, 121.47, 116.79, 114.75, 108.89, 106.06 ppm.

Masas Exactas (M+H): 481.1238 teóricas: 481.1236.

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-(2,6-dimetoxifenil)- 6-(4-isotiocianato-1H-pirazolil) piridina (15i).

Se sintetiza según el método general descrito en la pagina 193 para reacciones de Suzuki e hidrolisis simultanea usando microondas, a partir de **13** (119mg, 0.29mmol) y ácido 2,6-dimetoxifenilborónico (58.5mg, 0.32mmol), DMF seca (2.5mL) y disolución acuosa de hidróxido potásico 2M. (0,64mL). Se aísla el producto por centrifugación. Tras sucesivos lavados con éter se aísla el producto puro.



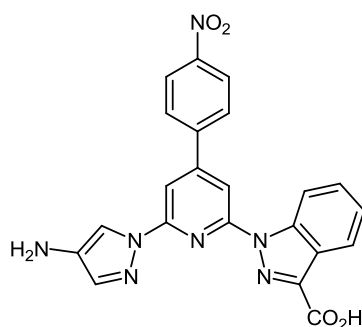
^1H -RMN (DMSO, 300MHz) δ : 8.92 (1H, s), 8.26 (1H, d, $J=8.11\text{Hz}$), 7.95 (1H, d, $J=8.33\text{ Hz}$), 7.84 (1H, s), 7.77 (1H, s), 7.68-7.75 (2H, m), 7.53 (1H, t, $J=7.01\text{ Hz}$), 7.45 (1H, t, $J=6.58\text{ Hz}$), 6.85 (2H, d, $J=8.12\text{ Hz}$), 3.74 (6H, s).

^{13}C -RMN (DMSO, 75MHz) δ : 157.25, 151.99, 151.73, 149.75, 149.31, 143.29, 139.81, 139.42, 137.93, 131.50, 129.44, 125.13, 122.74, 118.38, 115.27, 114.42, 112.39, 111.69, 109.45, 105.03, 56.50 ppm.

E.M. (MALDI $^+$): $m/z = 621$ ($[\text{M}]^+$, 100%).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-(fenil-p-nitro)-6-(4-amino-1H-pirazolil) piridina (15j)

Se sintetiza según el método general descrito en la página 193 para reacciones de Suzuki e hidrólisis simultanea usando microondas, a partir de **13** (120mg, 0.30mmol) y ácido 4-nitrofenilborónico (54.5mg, 0.32mmol), DMF seca (2.5mL) y disolución acuosa de hidróxido potásico 2M. (0,64mL). Se aísla el producto por centrifugación



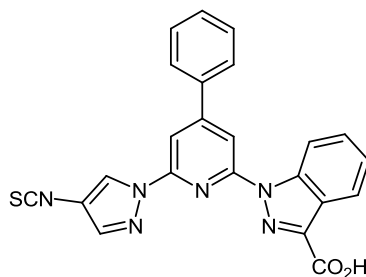
^1H -RMN (DMSO, 300MHz) δ : 8.91 (1H, s), 8.75 (1H, d, $J=8.67\text{ Hz}$), 8.41 (2H, d, $J=8.66\text{ Hz}$), 8.26 (1H, d, $J=7.90\text{ Hz}$), 8.23 (2H, d, $J=8.45\text{ Hz}$), 8.15 (1H, s), 8.03 (1H, s), 7.73 (1H, t, $J=7.91\text{ Hz}$), 7.54 (1H, t, $J=7.91\text{ Hz}$) ppm.

^{13}C -RMN (DMSO, 75MHz) δ : 162.58, 152.11, 150.83, 149.61, 148.12, 142.15, 139.18, 139.12, 137.51, 128.93, 128.54, 124.63, 124.41, 124.19, 122.26, 121.92, 118.17, 114.68, 109.07, 106.29 ppm.

Masas FB+ (M+H) 442.1 (100%), 443.1 (60%), 444.1 (20%)

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-fenil-6-(4-isotiocianato-1H-pirazolil) piridina (16a).

Se sintetiza según el procedimiento general para la transformación del grupo amino en grupo isotiocinato descrito en la página 193 a partir de **15a** (40,8mg, 0,1 mmol). Se obtiene el producto **16a** (Rto= 45%).



¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 9.13 (1H, s), 8.83 (1H, d, *J*=8.48 Hz), 8.29 (1H, s), 8,26-8.23 (2H, m), 8.12 (1H, s), 7.95-7.92 (2H, m), 7.76 (1H, t, *J*=8.03 Hz), 7.63-7.57 (3H, m), 7.52 (1H, t, *J*=7.60 Hz) ppm.

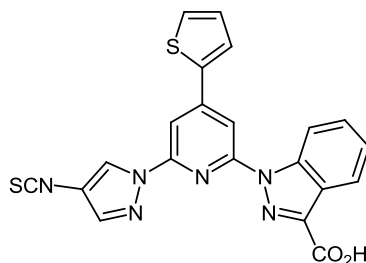
MS FB+ (M+1) 439.1 (100%), 440.1 (25%) Teórico: 439.0 (100%), 440.1 (25%)

E.M. (MALDI⁺): *m/z*= 461.1 ([M]+Na⁺, 100%).

I.R. (KBr) (*ν cm*⁻¹) : 2135 (S=C=N), 1605 (C=O), 1412 (C-O).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-tiofenil- 6-(4-isotiocianato-1H-pirazolil) piridina (16b).

Se sintetiza según el procedimiento general para la transformación del grupo amino en grupo isotiocinato descrito en la página 193 a partir de **15b** (60 mg, 0,11 mmol). Se obtiene el producto **16b** (Rto=60%).



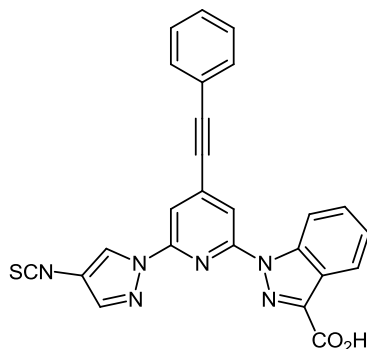
¹H-RMN (DMSO, 300 MHz) δ: 9.08 (1H,s), 8.70 (1H, d, *J*= 8.81 Hz), 8.42 (1H, d, *J*=7.92 Hz), 8.28 (1H, s), 8.20 (1H, s), 8.03 (1H, d, *J*=4.40Hz), 7.96 (1H, s), 7.86 (1H, d, *J*=4.41 Hz), 7.61 (1H, t, *J*=7.92 Hz), 7.35 (1H, t, *J*=7.26Hz), 7.29 (1H, t, *J*= 4.40 Hz)ppm.

MS Maldi (M+Na): 467.1 (100%), 468.1 (22%), 469.1 (13%).

I.R. (KBr) (ν cm⁻¹) : 2138 (S=C=N), 1607 (C=O), 1411 (C-O).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-fenilieninil- 6-(4-isotiocianato-1H-pirazolil) piridina (16c).

Se sintetiza según el procedimiento general para la transformación del grupo amino en grupo isotiocinato descrito en la página 193 a partir de **15c** (52 mg, 0,123 mmol) Se obtiene el producto **16c** (Rto=40%).



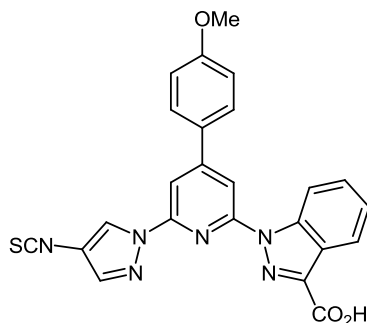
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ : 9.13 (1H, s), 8.83 (1H, d, J =8.48 Hz), 8.29 (1H, s), 8,26-8.23 (2H, m), 8.12 (1H, s), 7.76-7.60 (3H, m), 7.63-7.57 (3H, m) ppm.

Maldi (M+Na) 485.2 (100%).

I.R. (KBr) (ν cm⁻¹) : 2132 (S=C=N), 1605 (C=O), 1411 (C-O).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-(p-metoxifenil)- 6-(4-isotiocianato-1H-pirazolil) piridina (16d)

Se sintetiza según el procedimiento general para la transformación del grupo amino en grupo isotiocinato descrito en la página 193 a partir de **15d** (40,2mg, 0,94 mmol). Se obtiene el producto **16d** (Rto= 43%).



¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ : 9.08 (1H, s), 8.81 (1H, d, J =8.34Hz), 8.27-8.22 (2H, m), 8,17 (1H, s), 8.05 (1H, s), 7.90 (2H, d, J =8.66 Hz), 7.75 (1H, t, J =6.69Hz), 7.13 (2H, d, J =7.34Hz), 7.59 (1H, t, J =6.41Hz), 3.86 (3H, s) ppm.

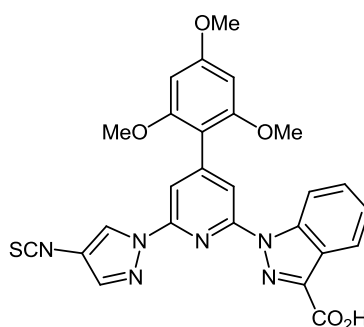
MS FB+ (M+1) 469.1 (100%), 470.1 (30%) Teórico: 469.1 (100%), 470.1 (28%)

E.M. (MALDI⁺): m/z= 469.1 ([M]⁺, 100%).

I.R. (KBr) (ν cm⁻¹) : 2123 (S=C=N), 1612 (C=O), 1381 (C-O).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-(2,4,6-trimetoxifenil)- 6-(4-isotiocianato-1H-pirazolil) piridina (16e).

Se sintetiza según el procedimiento general para la transformación del grupo amino en grupo isotiocinato descrito en la página 193 a partir de **15e** (40 mg, 0,1 mmol). Se obtiene el producto **16e** (Rto= 63%).

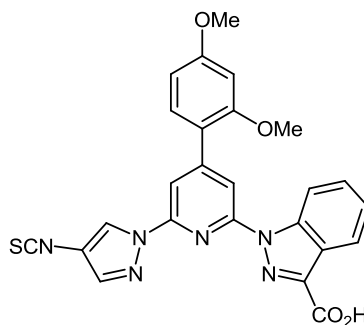


¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ : 9.07 (1H, s), 8.74 (1H, d, J=8.11Hz), 8.29 (1H, s), 8.25 (1H, d, J=8.27z), 8.13 (1H, s), 8.01 (1H, s), 7.74 (1H, t, J=7.51Hz), 7.51 (1H, t, J=7.74Hz), 6.40 (2H, s), 3.86 (3H, s), 3.74 (6H, s) ppm.

I.R. (KBr) (ν cm⁻¹) : 2140 (S=C=N), 1605 (C=O), 1411 (C-O).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-(2,4-dimetoxifenil)- 6-(4-isotiocianato-1H-pirazolil) piridina (16f).

Se sintetiza según el procedimiento general para la transformación del grupo amino en grupo isotiocinato descrito en la página 193 a partir de **15f** (41,8mg, 0,09 mmol). Se obtiene el producto **16f** (Rto= 59%).



¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 9.08 (1H, s), 8.80 (1H, d, $J=8.27\text{Hz}$), 8.26 (1H, s), 8.23 (1H, d, $J=8.33\text{Hz}$), 8.09 (1H, s), 8.01 (1H, s), 7.74 (1H, t, $J=7.94\text{Hz}$), 7.56-7.48 (2H, m), 6.69-6.77 (2H, m), 3.86 (3H, s), 3.85 (3H, s) ppm.

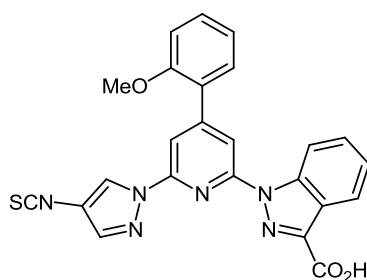
MS FB+ (M+1) 499.1 (100%), 500.1 (30%) Teórico: 499.1 (100%), 500.1 (28%)

E.M. (MALDI⁺): $m/z = 521$ ([M]+Na⁺, 100%).

I.R. (KBr) ($\nu\text{ cm}^{-1}$) : 2133 (S=C=N), 1607 (C=O), 1416 (C-O).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-(*o*-metoxifenil)-6-(4-isotiocianato-1H-pirazolil) piridina (16g).

Se sintetiza según el procedimiento general para la transformación del grupo amino en grupo isotiocinato descrito en la página 193 a partir de **15g** (42 mg, 0,09 mmol). Se obtiene el producto **16g** (Rto=50%).



¹H-RMN (DMSO, 300MHz) δ: 9.09 (1H, s), 8.71 (1H, d, $J=8.72\text{ Hz}$), 8.41 (1H, d, $J=7.62\text{ Hz}$), 8.25 (1H, s), 8.11 (1H, s), 7.91 (1H, s), 7.63-7.49 (3H, m), 7.35 (1H, t, $J=7.94\text{Hz}$), 7.23 (1H, d, $J=8.33\text{ Hz}$), 7.13 (1H, t, $J=7.56\text{ Hz}$), 3.84 (3H, s) ppm.

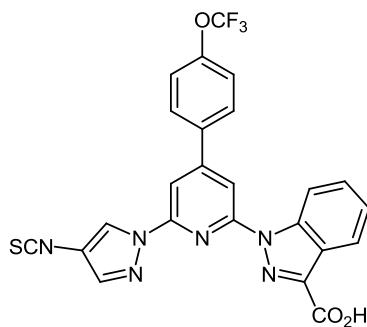
MS FB+ (M+1) 469.1 (100%), 470.1 (30%) Teórico: 469.1 (100%), 470.1 (30%)

E.M. (MALDI⁺): $m/z = 491.1$ ([M]+Na⁺, 100%).

I.R. (KBr) ($\nu\text{ cm}^{-1}$) : 2135 (S=C=N), 1607 (C=O), 1418 (C-O).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-(*p*-trifluorometoxifenil)- 6-(4-isotiocianato-1H-pirazolil) piridina (16h).

Se sintetiza según el procedimiento general para la transformación del grupo amino en grupo isotiocinato descrito en la página 193 a partir de **15h** (38 mg, 0,088 mmol). Se obtiene el producto **16h** (Rto=62%).



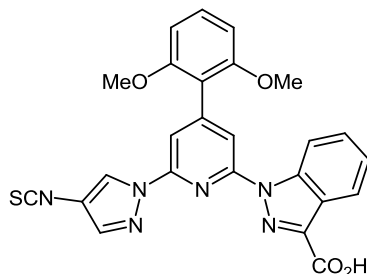
^1H -RMN (DMSO, 300MHz) δ : 9.06 (1H, s), 8.78 (1H, d, $J=7.57$ Hz), 8.25-8.18 (2H, m), 8.06-7.99 (3H, m), 7.57-7.47 (4H, m) ppm.

MS FB^+ (M-OH)= 505.2 (100%), 506.2 (30%), teórico =505.1 (100%), 506.1 (30%).

I.R. (KBr) ($\nu \text{ cm}^{-1}$) : 2125 (S=C=N), 1614 (C=O), 1381 (C-O).

Síntesis de 2-(3-carboxil-1H-indazolil)-4-(2,6-dimetoxifenil)- 6-(4-isotiocianato-1H-pirazolil) piridina (16i).

Se sintetiza según el procedimiento general para la transformación del grupo amino en grupo isotiocinato descrito en la página 193 a partir de **15i** (40 mg, 0,09 mmol). Se obtiene el producto **16i** (Rto=54%).



^1H -RMN (DMSO, 300MHz) δ : 9.07 (1H, s), 8.30 (1H, s), 8.23 (1H, d, $J=7.95$ Hz), 8.03 (1H, d, $J=7.95$ Hz), 7.92-7.86 (2H, m), 7.73 (2H, d, $J=7.24$ Hz), 7.77 (1H, s), 7.56-7.41 (2H, m), 3.74 (6H, s) ppm.

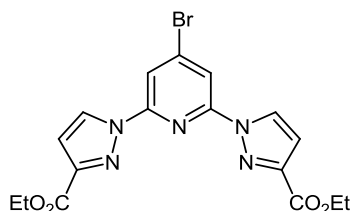
MS FB^+ (M+H)= 499.2 (100%), 500.2 (30%), teórico =499.1 (100%), 500.1 (30%).

I.R. (KBr) ($\nu \text{ cm}^{-1}$) : 2133 (S=C=N), 1614 (C=O), 1411 (C-O).

Síntesis de 4-Bromo-2,6-bis-(3-dietoxycarbonil-1H-pirazolil) piridina (2).

Se disuelve el 3-etoxicarbonilpirazol (2.1 mmol) y 4-Bromo-2,6-difloropiridina (1mmol) en THF (15 mL), en atmosfera inerte. Se enfria a 0°C y se le añade adiciona hidruro sódico (2.2 mmol). Se agita durante 4 horas. Transcurrida la reacción, se elimina el

disolvente, se lava con agua y se extrae con diclorometano. La fase orgánica se seca y se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM:Hexano 1:1). (Rto 89%)



^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.55 (2H, d, J = 2.6 Hz), 8.28 (2H, s), 7.01 (2H, d, J = 2.6 Hz), 4.46 (4H, c, J = 7.1 Hz), 1.44 (6H, t, J = 7.2 Hz).ppm

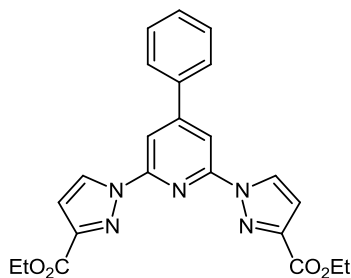
^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 161.7; 149.7; 146.9; 137.4; 128.6; 114.6; 110.7; 61.5; 14.3 ppm.

Análisis Elemental %: C 47.02, H 3.71, N 16.13 (teórico); C 46.82, H 3.57, N 15.72 (medido)

E.M. (EI^+): m/z = 435.0 ($[\text{M}]^+$, 100%), 433 ($[\text{M}]^+$, 100%).

Síntesis de 4-fenil-2,6-bis-(3-dietoxycarbonil-1-pirazolil)piridina (17a).

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 192 para reacciones de Suzuki en microondas, a partir de 215 mg (0.5 mmol) de **2**. Se obtienen 130 mg (0.31 mmoles) de **17a**. (62%)



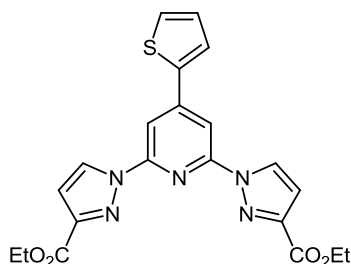
^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.64 (2H, d, J =2.63 Hz), 8.31 (2H, s), 7.84 (2H, dd, J_1 =7.87, J_2 =1.98 Hz), 7.54-7.50 (3H, m), 7.03 (2H, d, J = 2.63 Hz), 4.46 (4H, c, J =7.24 Hz), 1.44 (6H, t, J =7.24 Hz) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 161.8, 149.1, 146.2, 139.2, 137.8, 130.3, 129.1, 128.2, 127.8, 113.5, 109.2, 61.8, 14.3 ppm.

E.M. (ESI^+): m/z = 432.16 ($[\text{M}]^+$, 100%).

Síntesis de 2,6-bis-(3-dietoxicarbonil-1H-pirazolil)-4-tiofenilpiridina (17b).

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 192 para reacciones de suzuki en microondas, a partir de 200 mg (0.34 mmol) de **2**. Tras purificar se obtienen 138 mg de **17b** (Rto 93%).



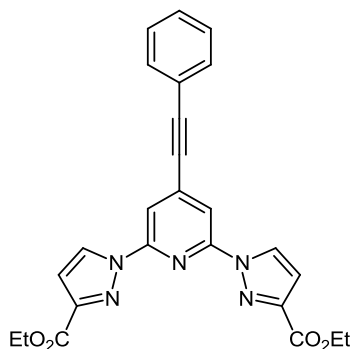
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ : 8.61 (2H, s, J = 2.63 Hz), 8.24 (2H, s), 7.78 (1H, dd, J_1 = 1.10, J_2 = 3.73 Hz), 7.52 (1H, dd, J_1 = 5.05, J_2 = 1.10 Hz), 7.19 (1H, dd, J_1 = 5.04, J_2 = 3.73 Hz), 7.01 (2H, d, J = 2.63 Hz), 4.47 (4H, c, J = 7.12 Hz), 1.45 (6H, t, J = 7.13 Hz) ppm

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ : 161.5, 151.9, 149.2, 140.5, 139.1, 135.0, 128.2, 125.0, 113.4, 112.9, 110.2, 61.4, 14.3 ppm.

Masas (FB+) [M+H] exp: 438.2 (100%), 439.2 (26%), 440.1 (8%) teórica: 438.1 (100%), 439.1 (25%), 440.1 (9%)

Síntesis de 4-feniletinil-2,6-Bis-(3-dietoxicarbonil-1H-pirazolil)piridina (17c).

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 192 para reacciones de sonogashira en microondas, a partir de 200mg (0.34mmol) de **2**. El producto se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice diclorometano/Hexano (9:1) obteniéndose 95 mg de **17c** (Rto 60%).



^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.57 (2H, d, J = 2.69 Hz), 8.20 (2H, s), 7.60-7.56 (2H, m); 7.41 (3H, dd, J = 2.02 Hz, 5.26 Hz), 7.01 (2H, d, J = 2.63 Hz), 4.47 (4H, c, J = 7.12 Hz), 1.44 (6H, t, J = 7.12 Hz) ppm

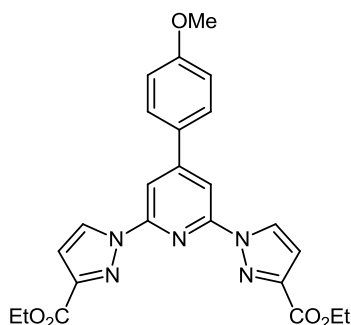
^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 161.7, 149.6, 146.6, 137.5, 132.18, 129.7, 128.6, 128.4, 121.6, 113.2, 110.5, 96.5, 85.9, 61.4, 14.3 ppm.

Análisis Elemental %: C 65.93, H 4.65, N 15.38 (teórico); C 65.46, H 4.68, N 13.81 (experimental)

E.M. (ESI^+): m/z = 456.16 ($[\text{M}]^+$, 100%).

Síntesis de 4-(fenil-*p*-metoxi)-2,6-Bis-(3-dietoxycarbonil-1-pirazolil)piridina (17d).

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 192 para reacciones de Suzuki, a partir de 200mg (0.34mmol) de **2**. El producto se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice diclorometano/Hexano (3:1), obteniéndose 125 mg de **17d** (Rto 83%)



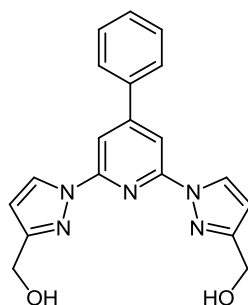
^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.61 (2H, d, J =2.63Hz), 8.27 (2H, s), 7.82 (2H, J =8.77Hz), 7.05-7.01 (4H,m), 4.46 (4H,c, J =7.23Hz), 3.89(3H,s), 1.44 (6H,t, J =7.24Hz)ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 162.09, 161.37, 154.47, 149.98, 146.33, 132.18, 128.84, 128.62, 114.54, 110.33, 108.46, 61.43, 55.47, 14.37 ppm.

Masas (FB+) $[\text{M}+\text{H}]$ exp: 462.2 (100%).

Síntesis de 2,6-bis-(3-hidroximetil-1-pirazolil)-4-fenilpiridina (18a).

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 193 para reducciones de grupos esteres, a partir de 120 mg (0.27 mmol) de **17a**. Obteniéndose el producto **18a** con un 78% de rendimiento (73mg).



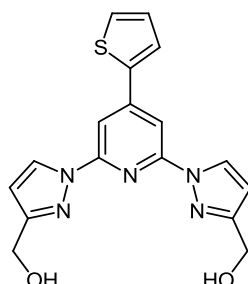
^1H -RMN (CDCl_3) δ (300 MHz): 8.55 (2H, d, $J = 2.41$ Hz), 8.05 (3H, s), 7.81 (2H, d, $J = 7.89$ Hz), 7.53-7.46 (3H, m), 6.49 (2H, d, $J = 2.43$ Hz), 4.84 (4H, d, $J = 3.97$ Hz) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 154.9, 151.5, 138.9, 128.3, 139.4, 129.0, 127.5, 126.8, 116.2, 111.6, 58.1 ppm.

Masas (FB+) $[\text{M}+\text{Na}]$ exp: 371.1 (100%)

Síntesis de 2,6-bis-(3-hidroximetil-1-pirazolil)-4-tiofen-piridina (18b).

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 193 para reducciones de grupos esteres, a partir de 120 mg de **17b**, obteniendos el producto **18b** como un sólido blanco.con un rendimiento de 92% (81mg)



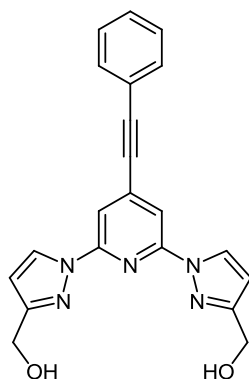
^1H NMR (DMSO , 300 MHz) δ : 8.63 (2H, s), 8.50 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 8.03 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 7.93 (1H, d, $J = 3.6$ Hz), 7.82 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 7.61 (2H, d, $J = 7.1$ Hz), 7.28–7.31 (1H, m), 4.74 (4H, s) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 155.2, 153.1, 142.4, 140.1, 136.0, 127.2, 123.6, 118.9, 112.2, 110.1, 56.9 ppm.

Masas (FB+) $[\text{M}+\text{Na}]$ exp: 375.1 (100%)

Síntesis de 2,6-bis-(3-hidroximetil-1-pirazolil)-4-feniletinil-piridina (18c)

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 193 para reducciones de grupos esteres, a partir 90 mg de **17c**. Se obtienen 63 mg del producto **18c** (Rto 87%).



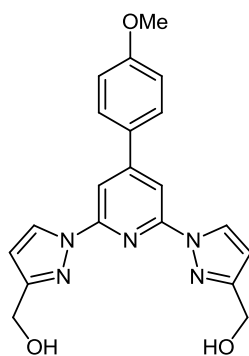
^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.52 (2H, d, $J=2.55$ Hz), 7.90 (2H, s), 7.59-7.55 (2H, m), 7.42-7.36 (3H, m), 6.49 (2H, d, $J=2.55$ Hz), 4.81 (4H, s) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 155.1, 153.9, 134.4, 132.0, 128.8, 128.6, 126.5, 124.1, 119.2, 110.9, 93.9, 91.1, 58.0 ppm.

Masas (FB+) $[\text{M}+\text{H}]$: 372.2 (100%)

Síntesis de 2,6-bis (3-hidroximetil-1-pirazolil)-4-(*p*-metoxifenil)piridina (18d).

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 193 para reducciones de grupos esteres, a partir de 100 mg de **17d**, obteniéndose 77mg de **18d** con un rendimiento del 86%.



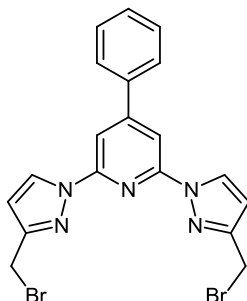
^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.58 (2H, d, $J= 2.41$ Hz), 8.05 (2H, s) 7.81 (2H, d, $J= 7.89$ Hz), 7.05 (2H, d, $J= 8.01$ Hz) 6.49 (2H, d, $J= 2.43$ Hz), 4.84 (4H, d, $J=3.97$ Hz), 3.91 (3H, s) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 158.9, 156.1, 151.4, 147.1, 140.7, 132.0, 127.8, 116. 2, 114.3, 109.9, 56.8, 55.5 ppm.

Masas (FB+) $[\text{M}+\text{H}]$ exp: 378.1 (100%)

Síntesis de 2,6-bis-(3-bromometil-1-pirazolil)-4-fenilpiridina (19a).

Siguiendo el procedimiento general para la sustitución de grupos hidroxilo por átomos de Bromo descrito en la página 193, se hace reaccionar 0.19 mmoles de **18a**, y se obtienen 82 mg del producto **19a** con un rendimiento del 89%.

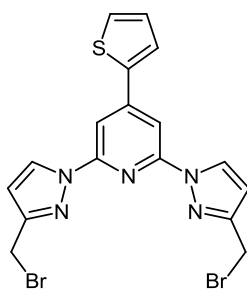


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.52 (2H, d, $J=2.63$ Hz), 8.07 (2H, s), 7.81 (2H, dd, $J_1=7.45$, $J_2=1.98$ Hz), 7.53-7.49 (3H, m), 6.57 (2H, d, $J=2.63$ Hz), 4.57 (4H, s) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 152.9, 150.5, 138.9, 137.4, 130.0, 128.4, 127.9, 126.8, 116.2, 110.16, 28.1 ppm.

Síntesis de 2,6-bis(3-bromometil-1-pirazolil)-4-tiofen-piridina (19b).

Siguiendo el procedimiento general para la sustitución de grupos hidroxilo por átomos de Bromo descrito en la página 193, a partir de 70mg (0.20mmol) de **18b**, se obtienen 78mg de **19b**, rendimiento 83%.

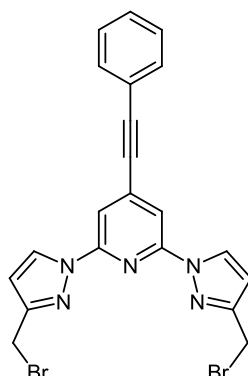


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.51 (2H, d, $J=2.63$ Hz), 8.02 (2H, s), 7.73 (1H, dd, $J_1=3.62$, $J_2=1.09$ Hz), 7.49 (1H, d, $J=5.15$ Hz), 7.18 (1H, dd, $J_1=5.04$, $J_2=3.73$ Hz), 6.56 (2H, d, $J=2.63$ Hz), 4.58 (4H, s)ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 152.2, 151.1, 141.4, 139.3, 135.6, 128.4, 124.6, 114.9, 112.6, 109.1, 28.6 ppm.

Síntesis de 2,6-bis(3-bromometil-1-pirazolil)-4- feniletinil-piridina (19c).

Siguiendo el procedimiento general para la sustitución de grupos hidroxilo por átomos de Bromo descrito en la página 193, se hace reaccionar el producto **18c** (63mg), obteniéndose el producto **19c** puro con un rendimiento del 94% (79mg).

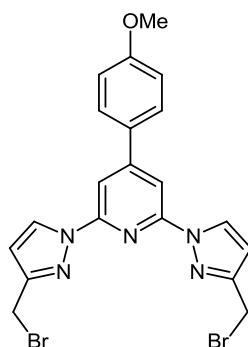


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.53 (2H, d, *J*=2.58 Hz), 7.93 (2H, s), 7.62-7.58 (2H, m), 7.45-7.33 (3H, m), 6.52 (2H, d, *J*=2.53 Hz), 4.53 (4H, s) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 152.8, 152.2, 132.2, 131.7, 128.6, 128.3, 127.3, 123.9, 118.4, 111.2, 93.6, 91.4, 26.9 ppm.

Síntesis de 2,6-bis(3-bromometil-1-pirazolil)-4-(*p*-metoxifenil)piridina (19d)

Siguiendo el procedimiento general para la sustitución de grupos hidroxilo por átomos de Bromo descrito en la página 193, se hace reaccionar 70 mg de **18d**, obteniéndose 78mg del producto **19d** con un rendimiento de 84%

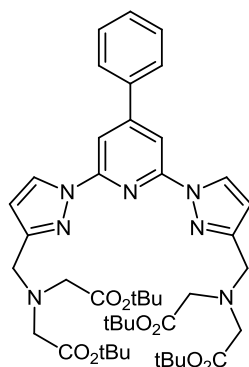


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.69 (2H, d, *J*= 2.54 Hz), 8.06 (2H, s) 7.85 (2H, d, *J*= 8.40 Hz), 7.11 (2H, d, *J*= 8.03 Hz), 6.57 (2H, d, *J*= 2.47 Hz), 4.54 (4H, s), 3.92 (3H, s) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 159.4, 152.3, 150.9, 147.2, 139.9, 131.7, 128.3, 116.4, 115.3, 111.2, 55.7, 27.2 ppm.

Síntesis de tetracetato de tetra-tert-butil *N,N,N1,N1*-[2,6-bis(3,3'-aminometil-1, -pirazolil)-4-fenilpiridina] (20a).

Se sintetiza siguiendo el procedimiento general descrito para este tipo de reacciones en la página 193 a partir de 75mg de **19a**, se obtienen 118mg de **20a** (93%)

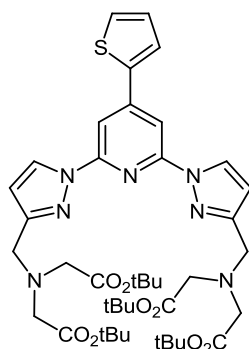


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.46 (2H, d, *J*=2.41 Hz), 7.98 (2H, s), 7.72 (2H, dd, *J*₁=7.67, *J*₂=1.75 Hz), 7.44-7.69 (3H, m), 6.50 (2H, d, *J*=2.41 Hz), 3.98 (4H, s), 3.44 (8H, s), 1.39 (36H, s) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 171.1, 152.4, 150.5, 141.3, 139.6, 131.4, 130.1, 128.3, 127.8, 116.1, 110.3, 86.1, 60.4, 54.8, 50.3, 28.1 ppm.

Síntesis de tetracetato de tetra-tert-butil *N,N,N1,N1*-[2,6-bis(3-aminometil-1 -pirazolil)-4-tienilpiridina] (20b).

Se sintetiza siguiendo el procedimiento general descrito para este tipo de reacciones en la página 193 a partir de 75mg de **19b** se obtienen 112 mg de **20b** (Rto 92%)

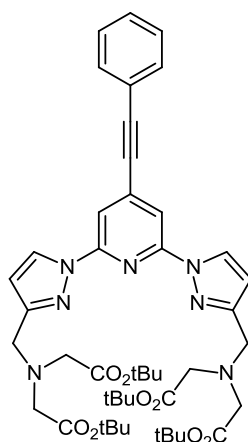


^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.44 (2H, s), 7.93 (2H, s), 7.62 (1H, d, J = 3.06 Hz), 7.40 (1H, d, J = 4.83 Hz), 7.08 (1H, t, J = 4.38 Hz), 6.49 (2H, s), 3.98 (4H, s), 3.43 (8H, s), 1.38 (36H, s) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 171.0, 152.9, 149.9, 139.7, 136.6, 131.9, 129.2, 127.9, 118.7, 110.8, 108.4, 95.2, 86.0, 60.4, 54.5, 50.7, 28.1, ppm.

Síntesis de tetracetato de tetra-tert-butil $N,N,N1,N1$ -[2,6-bis(3-aminometil-1 - pirazolil)-4-feniletinil-piridina] (20c)

Se sintetiza siguiendo el procedimiento general descrito para este tipo de reacciones en la página 193 a partir de **19c** (77mg), se obtienen 112mg de **20c** (Rto 86%).

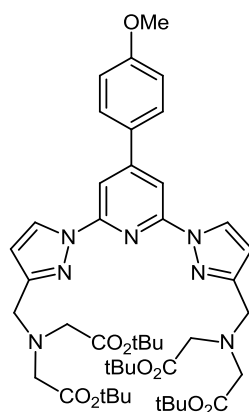


^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.45 (2H, d, J = 2.52 Hz), 7.88 (2H, s), 7.56-7.53 (2H, m), 7.39-7.36 (3H, m), 6.55 (2H, d, J = 2.58 Hz), 4.02 (4H, s), 3.49 (8H, s), 1.46 (36H, s) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 171.0, 152.0, 150.9, 132.5, 131.6, 129.1, 128.4, 127.3, 122.1, 116.4, 110.4, 93.2, 91.6, 86.3, 60.4, 55.0, 50.5, 28.0 ppm.

Síntesis de tetracetato de tetra-tert-butil $N,N,N1,N1$ -[2,6-bis(3-aminometil-1 - pirazolil)-4-p-metoxifenilpiridina] (20d)

Se sintetiza siguiendo el procedimiento general descrito para este tipo de reacciones en la página 193 a partir de 78mg de **19d**, obteniéndose 110mg del producto **20d** (Rto 90%)

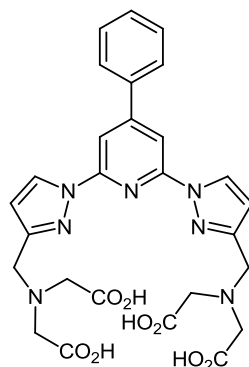


^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.46 (2H, d, $J=2.45$ Hz), 7.87 (2H, s), 7.85 (2H, d, $J=7.98$ Hz), 7.23 (2H, d, $J=8.00$ Hz) 6.50 (2H, d, $J=2.43$), 3.98 (4H, s), 3.96 (3H, s), 3.44 (8H, s), 1.39 (36H, s) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 171.2, 158.9, 151.2, 149.8, 147.2, 139.9, 131.7, 128.3, 116.4, 115.3, 111.2, 60.8, 54.7, 50.2, 28.1, 27.2 ppm.

Síntesis de ácido *N,N,N_1,N_1*-[2,6-bis(3-aminometil-1-pirazolil)-4-fenilpiridina] tetracético (**I-a**)

Siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis de ésteres tert-butilicos descrito en la página 193, se hacen reaccionar 115mg de **20a**. Tras la precipitación del producto **I-a** con éter etílico se obtienen 46 mg (Rto 57%)

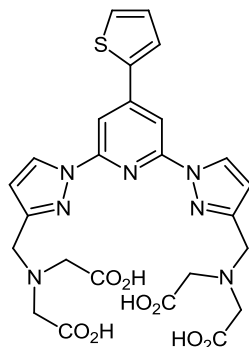


^1H -RMN ($\text{D}_2\text{O}/\text{NaOH}$, 300 MHz) δ : 8.20 (2H, s_b), 7.53 (2H, s_b), 7.42-7.37 (5H, m), 6.37 (2H, s_b), 3.60 (4H, s), 3.08 (8H, s) ppm.

Masas exactas (M+H): 578.1997 Teóricas: 578.1999.

Síntesis de ácido *N,N,N₁,N₁*-[2,6-bis(3-aminometil-1-pirazolil)-4-tienilpiridina] tetracético (I-b)

Siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis de ésteres tert-butilicos descrito en la página 193, se hacen reaccionar 112mg de **20b**. Tras la precipitación del producto **I-b** con éter etílico se obtienen 55mg (Rto 64%).

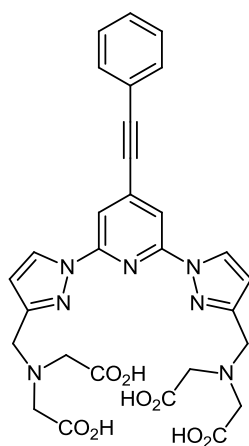


¹H-RMN (D₂O/NaOH, 300 MHz) δ: 8.34 (2H, s_b), 7.61-7.53 (4H, m), 7.11 (1H, t, *J*=4.33 Hz), 6.48 (2H, d, *J*=2.45 Hz), 3,74(4H, s), 3.18 (8H, s)ppm.

Maldi-TOF MS (M+1): 584.2 (100%)

Síntesis de ácido *N,N,N₁,N₁*-[2,6-bis(3-aminometil-1-pirazolil)-4-feniletinil piridina] tetracético (I-c).

Siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis de ésteres tert-butilicos descrito en la página 193, se hacen reaccionar 112mg de **20c**. Tras la precipitación del producto **I-c** con éter etílico se obtienen 39 mg (Rto 65%).

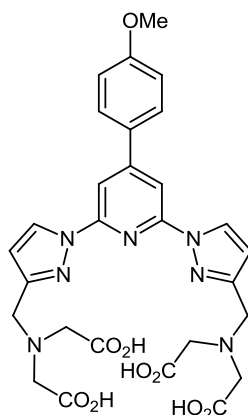


¹H-RMN (D₂O/NaOH, 300 MHz) δ: 8.04 (2H, s), 7.33-7.10 (7H, m), 6.20 (2H, s), 3.51 (4H, s), 3.11 (8H, s) ppm.

Masas Exactas: 602.2020 Teóricas: 602.1993

Síntesis de ácido *N,N,N_1,N_1*-[2,6-bis(3-aminometil-1-pirazolil)-4-*p*-metoxifenil piridina] tetracético (I-d).

Siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis de ésteres tert-butilicos descrito en la página 193, se hacen reaccionar 110mg de **20d**. Tras la precipitación del producto **I-d** con éter etílico 48mg (Rto 59%).

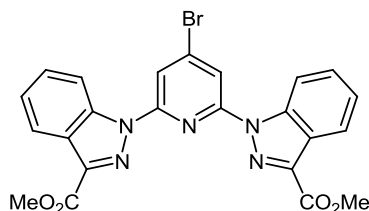


¹H-RMN (D₂O/NaOH, 300 MHz) δ: 8.22 (2H, s), 7.49 (2H, d, *J*=7.45), 7.44-7.38 (4H, m), 6.40 (2H, s), 3.94 (3H, s), 3.61 (4H, s), 3.10 (8H, s) ppm.

Masas: (M+H) 608.1 (100%), 609.1 (29%), 610.2 (3%); Teórica 608.2 (100%), 609.2 (32%), 610.2 (6%)

Síntesis de 4-Bromo-2,6-bis-(3-dimetoxycarbonil-1-indazolil)piridina (21).

En un matraz Schlenck se disuelve 3 metoxycarbonilindazol (2.1mmol) 4-Bromo-2,6-difluoropiridina en dimetilformamida (1 mmol), bajo atmosfera inerte a 0°C. Se adiciona hidruro sódico (2.2 mmol) y se calienta la reacción a 40°C durante 3 horas. Se añade agua a la mezcla y se decanta la fase acuosa. El sólido se seca a vacio y se obtiene el producto puro con 80% de rendimiento.

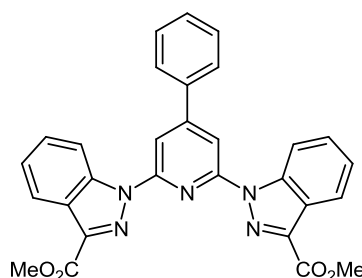


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.57 (2H, d, *J*= 8.56 Hz), 8.31 (2H, d, *J*=7.84 Hz), 8.24 (2H, s), 7.51 (2H, t, *J*=8.33 Hz), 7.42 (2H, t, *J*=8.00 Hz), 4.08 (3H, s) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 162.1, 151.9, 140.0, 139.2, 136.5, 128.8, 124.8, 125.1, 122.5, 115.8, 114.7, 52.5 ppm.

Síntesis de 4-fenil-2,6-Bis (3-dietoxicarbonil-1-pirazolil)piridina (22a).

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 192 para reacciones de suzuki en microondas, a partir de **21** (100mg, 0,19 mmol). El producto se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice diclorometano/Hexano (3:1). Se obtienen 59mg de **22a** (62%)

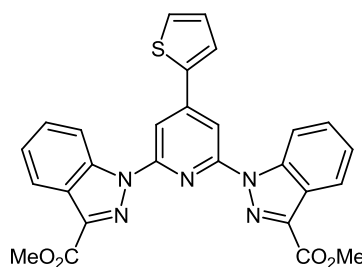


^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.71 (2H, d, $J=8.55$ Hz), 8.35 (2H, d, $J=8.22$ Hz), 8.31 (2H, s), 7.88 (2H, dd, $J_1=7.57$, $J_2=1.82$ Hz), 7.58-7.43 (7H, m), 4.12 (6H, s) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 162.4, 154.2, 151.6, 139.8, 137.7, 134.7, 129.5, 128.7, 128.1, 127.4, 127.1, 124.6, 121.8, 114.6, 110.5, 52.0 ppm.

Síntesis de 4-tienil-2,6-Bis-(3-dietoxicarbonil-1-pirazolil)piridina (22b).

Se sintetiza según el procedimiento general descrito para reacciones de suzuki en microondas (página 192), a partir de **21** (130mg, 0.26 mmol), obteniéndose 77 mg (61%)



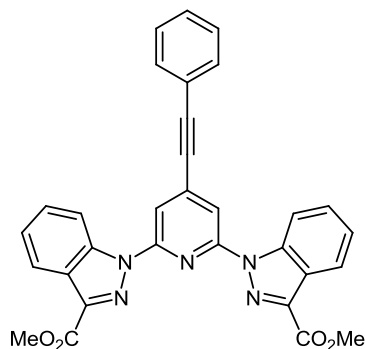
^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.67 (2H, d, $J=8.31$ Hz), 8.34 (2H, d, $J=8.31$ Hz), 8.25 (2H, s), 7.79 (1H, d, $J=3.40$ Hz), 7.54-7.42 (5H, m), 7.20 (1H, t, $J=4.13$ Hz), 4.13 (6H, s) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 161.7, 151.2, 142.5, 139.1, 138.2, 137.1, 135.0, 126.6, 125.9, 122.7, 121.9, 119.4, 117.1, 114.2, 112.6, 51.1 ppm.

Maldi $[\text{M}+\text{H}]^+=510$ (100%)

Síntesis de 4-feniletinil-2,6-Bis (3-dimetoxicarbonil-1-indazolil)piridina (22c).

Se sintetiza según el procedimiento general descrito para reacciones de sonogashira en microondas, a partir de **21** (120 mg, 0.23 mmol). El producto se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice diclorometano/Hexano (9:1), obteniéndose 66 mg de **22c** (Rto 54%)

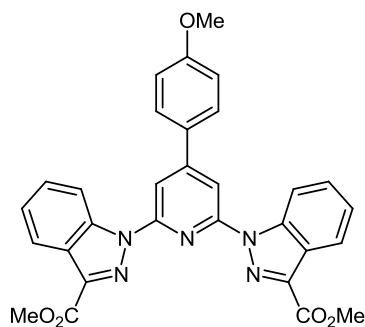


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.67(2H,d, J=8.33Hz), 8.35(2H,d,J=7.68Hz), 8,20(2H,s), 7.62-7.56 (2H,m), 7.53 (2H,t, J=7.2Hz), 7.48-743 (5H,m), 4.14 (6H,s)ppm

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 162.66, 151.75, 140.03, 138.50, 136.86, 132.17, 129.61, 128.69, 128.61, 126.61, 125.11, 124.69, 122.37, 121.78, 114.84, 114.65, 93.36, 93.01, 52.48ppm.

4-(fenil-p-metoxi)-2,6-Bis-(3-dimetoxicarbonil-1H-indazolil)piridina (22d).

Se sintetiza según el procedimiento general descrito para reacciones de suzuki en microondas (página 192), a partir de **21** (120 mg, 0.23 mmol). El sólido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice diclorometano/Hexano (3:1), obteniéndose 60mg de **22d** (Rto 48%).

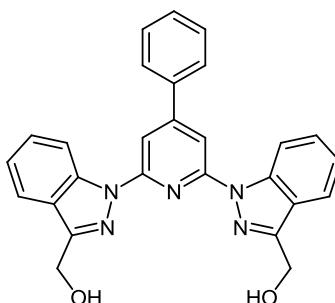


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.68 (2H, d, J=8.41 Hz), 8.33 (2H, d, J=8.18 Hz), 8.34 (2H, s), 7.82 (2H, d, J= 8.43 Hz), 7.55 (2H, t, J= 4.56Hz), 7.43-7.29 (4H, m), 4.12 (6H, s), 3.99 (3H, s) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 162.4, 159.8, 151.0, 140.6, 139.9, 137.7, 136.5, 129.5, 128.7, 123.1, 122.7, 121.1, 120.6, 119.8, 114.6, 110.5, 55.2, 52.4 ppm.

Síntesis de 2,6-bis(3,3'-hidroximetil-1.1'-indazolil)-4-fenilpiridina

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 193a partir de **22a** (58mg). Se obtienen 50mg de **23a** (Rto 94%).

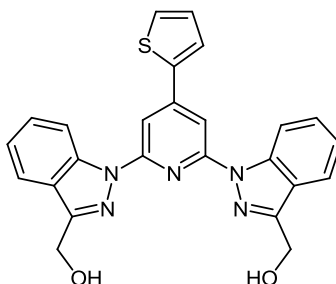


^1H -RMN (CDCl_3) δ (300 MHz): 8.71 (2H, d, J = 8.55 Hz), 8.08 (2H, s), 7.91 (2H, d, J = 8.34 Hz), 7.86 (2H, dd, J_1 =8.12, J_2 = 1.32 Hz), 7.60 (1H, s), 7.54-7.45 (6H, m), 5.18 (4H, s) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 159.9, 149.7, 141.2, 135.9, 133.3, 130.4, 129.0, 127.5, 125.9, 121.2, 120.8, 116.2, 111.6, 59.7 ppm.

Síntesis de 2,6-Bis (3-hidroximetil-1-indazolil)-4-tiofen-piridina(23b)

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 193, a partir de 70 mg de **22b**, obteniéndose 58mg de **23b** (Rto. 91%).



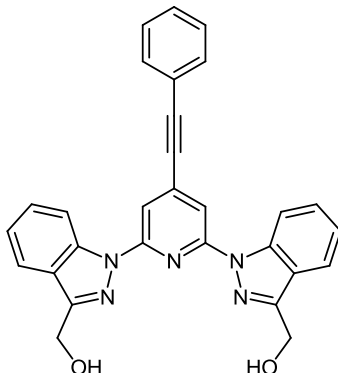
^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.74 (2H, d, J = 7.23 Hz), 8.10 (2H, s), 7.94 (2H, d, J =7.89 Hz), 7.71 (1H,s), 7.54 (3H, m), 7.17-7.14 (3H, m), 5.25 (4H, s)ppm

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 163.2, 150.1, 144.6, 140.8, 138.7, 135.0, 127.6, 125.9, 122.4, 121.4, 120.9, 118.4, 111.3, 110.4, 57.3 ppm.

Masas $[\text{M}+\text{H}]$ exp: 454.1 (100%), 455.1 (31%), 456.1 (12%) teórica: 454.1 (100%), 455.1 (30%), 456.1 (9%)

Síntesis de 2,6-bis(3,3'-hidroximetil-1,1'-indazolil)-4-feniletinil-piridina

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 193, a partir de 66mg de **22c**. Se obtiene **23c** (51mg, 106mmoles, Rto 86%).

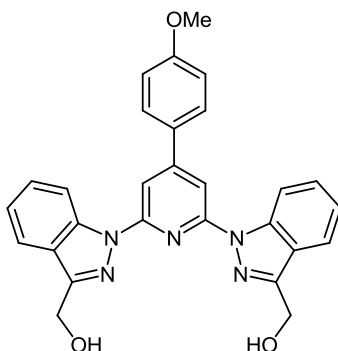


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.67 (2H, d, *J*=8.55 Hz), 7.94 (2H, s), 7.90 (2H, d, *J*=8.11 Hz), 7.59 (2H, m), 7.45-7.30 (7H, m), 5.18 (4H, s) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 162.5, 150.8, 133.4, 131.7, 128.8, 125.6, 124.3, 122.6, 122.1, 121.7, 114.4, 112.5, 92.9, 92.0, 57.6 ppm.

Síntesis de 2,6-Bis(3,3'-hidroximetil-1,1'-indazolil)-4-(p-metoxifenil)piridina (23d).

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la página 193, a partir de 60 mg de **22d**, obteniéndose 48mg (0.10 mmol) de **23d** (Rto 89%).

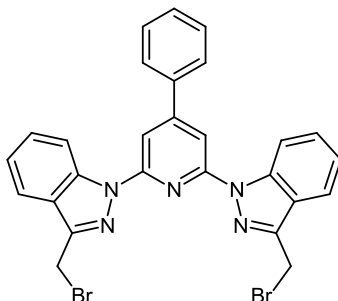


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.70 (2H, d, *J*=8.67 Hz), 8.03 (2H, s), 7.89 (2H, d, *J*=8.26 Hz), 7.82 (2H, d, *J*=8.67 Hz), 7.40 (2H, t, *J*=7.54 Hz), 7.32 (2H, t, *J*=7.17 Hz), 7.04 (2H, d, *J*=9.04 Hz), 5.18 (4H, s), 3.89 (3H, s) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 160.3, 159.7, 150.4, 144.2, 139.9, 133.3, 130.4, 129.0, 127.5, 121.2, 120.4, 119.2, 114.5, 111.6, 59.7, 50.3 ppm.

Síntesis de 2,6-Bis(3'-bromometil-1'-indazolil)-4- fenilpiridina (24a)

Siguiendo el procedimiento general descrito, se hace reaccionar 50mg de **23a** (105mmoles). Tras la extracción se obtiene 60mg el producto **24a** con un rendimiento 95%

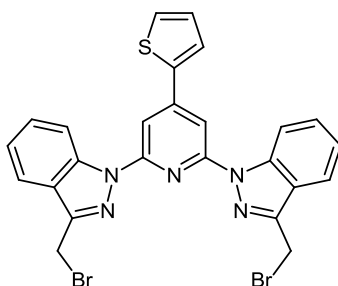


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.71 (2H, d, *J*= 8.55 Hz), 8.11 (2H, s), 7.92 (2H, d, *J*=7.89 Hz), 7.87 (2H, dd, *J*₁=8.12, *J*₂= 1.54 Hz), 7.64 (2H, dd, *J*₁=8.33, *J*₂= 1.53 Hz), 7.52-7.36 (5H, m), 4.94 (4H, s) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 152.4, 144.8, 140.0, 132.2, 130.1, 128.5, 128.3, 126.4, 124.2, 122.2, 120.3, 115.2, 114.8, 29.8 ppm.

Síntesis de 2,6-bis(3'-bromometil-1'-indazolil)-4-tiofen-piridina

Siguiendo el procedimiento general descrito en la página 193, se hace reaccionar **23b** (56mg), obteniéndose 65mg de **24c** (Rto. 89%).

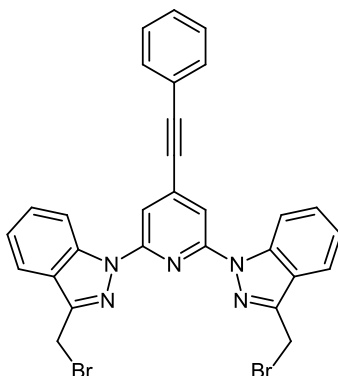


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.65 (2H,d,*J*=8.55Hz),8.04 (2H,s), 7.91 (2H,d, *J*=7.89Hz), 7.74 (1H,d,*J*=2.85Hz), 7.51-7.46 (5H,m), 7.36 (2H,t, *J*=7.45Hz), 7.19 (1H,t, *J*=3.73Hz), 4.94 (4H,s)ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 150.9, 149.3, 144.8, 139.1, 136.5, 135.0, 127.1, 125.6, 123.0, 119.4, 117.1, 114.2, 112.6, 30.1 ppm.

Síntesis de 2,6-bis(3'-bromometil-1'-indazolil)-4- feniletinil-piridina.

Siguiendo el procedimiento general descrito, se hace reaccionar el 50mg de **23c**. Se obtiene 55mg de **24c** con un rendimiento 85%.

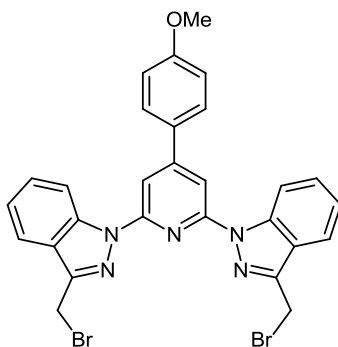


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ : 8.65 (2H, d, J = 8.55Hz), 7.97 (2H, s), 7.92 (2H, d, J =7.98 Hz), 7.63-7.53 (2H, m), 7.44-7.40 (4H, m), 7.37 (2H, t, J =7.01 Hz), 4.92 (4H, s) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ : 151.9, 145.2, 133.2, 132.9, 128.9, 128.6, 127.4, 126.6, 124.1, 123.9, 122.82, 120.30, 115.19, 114.48, 93.4, 91.0, 29.8 ppm.

Síntesis de 2,6-Bis(3'-bromometil-1'-indazolil)-4-(*p*-metoxifenil)piridina

Siguiendo el procedimiento general descrito, se hace reaccionar el **23d** (48mg), obteniéndose tras la purificación 52 mg de **24d** (Rto 86%).

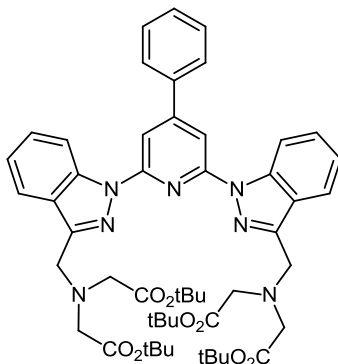


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ : 8.69 (2H,d, J =8.58Hz), 8.07 (2H,s), 7.92 (2H,d, J =7.92Hz), 7.84 (2H,d, J =8.80Hz),7.50 (2H,t, J =7.26Hz),7.37 (2H,t, J =7.52Hz), 7.06 (2H,d, J =6.82Hz), 4.94 (4H,s), 3.90 (3H,s)ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ : 160.95, 152.32, 144.68, 140.01, 132.21, 130.00, 128.55, 128.34, 124.11, 122.82, 120.30, 115.19, 114.48, 55.44, 29.68 ppm.

Síntesis del tetracetato de tetra-tert-butil *N,N,N_1,N_1*-[2,6-Bis(3,3'-aminometil-1,1'-indazolil)-4-fenilpiridina] (25a).

Se sintetiza siguiendo el procedimiento general descrito para este tipo de reacciones en la página 193 a partir de Se obtienen 85 mg de **25a** (Rto 90%)

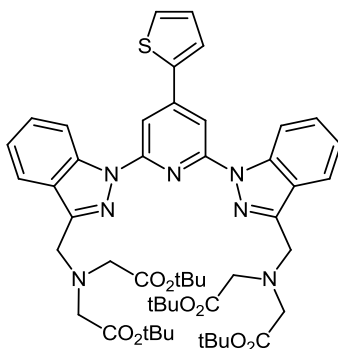


^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.70 (2H, d, $J=8.55$ Hz), 8.20 (2H, d, $J=8.55$ Hz), 8.04 (2H, s), 7.81 (2H, dd, $J_1=8.22$, $J_2=1.75$ Hz), 7.54-7.38 (7H, m), 4.39 (4H, s), 3.55 (8H, s), 1.44 (36H, s)ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 170.0, 152.7, 152.1, 146.2, 139.9, 130.5, 129.7, 128.5, 127.9, 125.6, 122.5, 121.7, 114.4, 114.3, 107.7, 81.1, 57.3, 50.4, 28.0 ppm.

Síntesis del tetracetato de tetra-tert-butil *N,N,N_1,N_1*-[2,6-Bis(3,3'-aminometil-1,1'-indazolil)-4-tienilpiridina] (25b).

Se sintetiza siguiendo el procedimiento general descrito para este tipo de reacciones en la página 193 a partir de

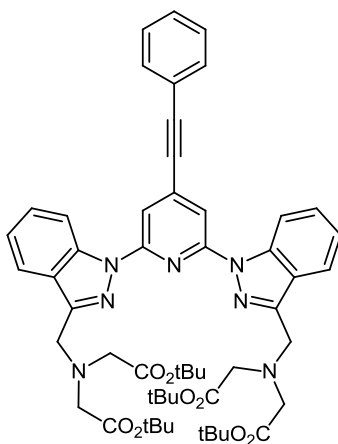


^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.54 (2H, d, $J=8.41$ Hz), 8.16 (2H, d, $J=7.68$ Hz), 7.92 (2H, s), 7.74 (1H, s), 7.42 (1H, s), 7.32-7.11 (5H, m), 4.41 (4H, s), 3.53 (8H, s), 1.42 (36H, s)ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 170.4, 151.9, 150.1, 142.6, 139.7, 138.6, 134.9, 129.2, 125.9, 124.1, 120.5, 119.9, 118.7, 110.8, 108.4, 95.2, 82.0, 60.4, 54.5, 50.7, 28.1, ppm.

Síntesis del tetracetato de tetra-*tert*-butil *N,N,N₁,N₁*-[2,6-bis(3-aminometil-1-indazolil)-4-feniletinilpiridina]

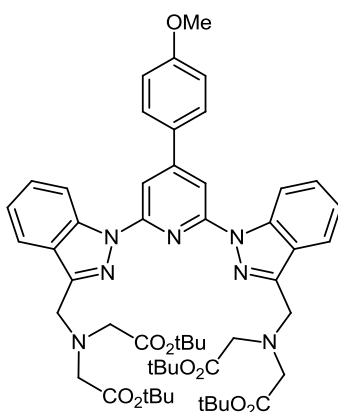
Se sintetiza siguiendo el procedimiento general descrito para este tipo de reacciones en la página 193 a partir de 53mg de **24c**. Se obtienen 75 mg de **25c** (Rto 88%).



¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.65 (2H, d, *J*= 8.49 Hz), 8.18 (2H, d, *J*=7.98 Hz), 7.92 (2H, s), 7.62-7.56 (2H, m), 7.48-7.36 (3H, m), 7.33-7.23 (2H, m), 4.38 (4H, s), 3.53 (8H, s), 1.41 (36H, s)ppm

Síntesis del tetracetato de tetra-*tert*-butil *N,N,N₁,N₁*-[2,6-bis-(3-aminometil-1-indazolil)-4-(*p*-metoxifenil)piridina]

Se sintetiza siguiendo el procedimiento general descrito para este tipo de reacciones en la página 193 a partir de 50mg de **24d**, obteniéndose 64mg (0.07mmoles) de **25d** (Rto 80%).

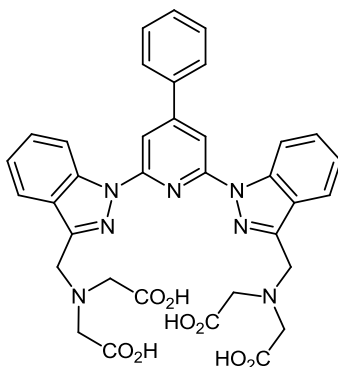


¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.54 (2H, d, *J*=8.65 Hz), 8.22 (2H, d, *J*=8.06 Hz), 7.98 (2H, s), 7.56 (2H, d, *J*=8.40 Hz), 7.48-7.18 (6H, m), 4.33 (4H, s), 3.92 (3H, s) 3.52 (8H, s), 1.44 (36H, s)ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 170.4, 160.7, 152.7, 152.5, 146.2, 139.9, 130.5, 128.5, 127.9, 125.6, 122.3, 121.7, 114.7, 114.3, 107.7, 81.0, 57.2, 55.6, 50.3, 28.2 ppm.

Tetra ácido N,N,N_1,N_1 -[2,6-Bis(3,3'-aminometil-1,1'-indazolil)-4-fenilpiridina](acético)

Se sintetiza siguiendo el procedimiento general para la hidrolisis de ésteres tert-butílicos descrito en la página 193 a partir de 85 mg de **25a**. Se obtienen 35mg (0,05 mmoles) de **II-a**.

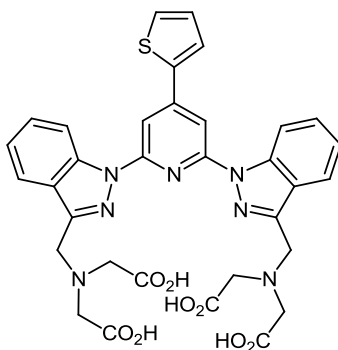


^1H -RMN ($\text{D}_2\text{O}/\text{NaOH}$, 300 MHz) δ : 8.40 (2H, s), 8.05 (2H, s), 7.95 (2H, s), 7.56 (2H, m), 7.41-7.17 (5H, m), 3.96(4H, s), 3.25(8H, s) ppm.

Masas FaB (M+H): 678.2 (100%) teóricas: 677.2 (100%)

Síntesis del ácido N,N,N_1,N_1 -[2,6-bis-(3-aminometil-1-indazolil)-4-tienilpiridina] tetracético (II-b).

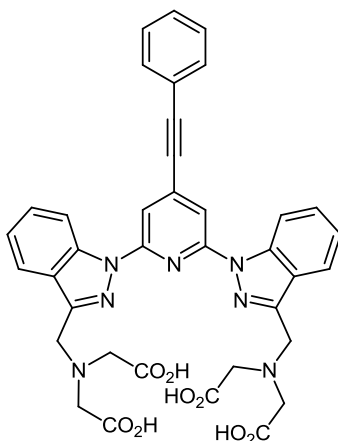
Se sintetiza siguiendo el procedimiento general para la hidrolisis de ésteres tert-butílicos descrito en la página 193 a partir de **25b**



^1H -RMN ($\text{D}_2\text{O}/\text{NaOH}$, 300 MHz) δ : 8.60 (2H, d, $J=7.82$ Hz), 8.29 (2H, d, $J=7.49$ Hz), 8.17 (2H, s), 8.08 (1H, d, $J=5.42$ Hz), 7.91 (1H, d, $J=5.47$ Hz), 7.62 (2H, t, $J=8.10$ Hz), 7.50 (2H, t, $J=7.92$ Hz), 3.98(4H, s), 3.26(8H, s) ppm

Síntesis del ácido *N,N,N,N*-[2,6-bis-(3-aminometil-1-indazolil)-4-feniletinil piridina] tetracético (II-c)

Se sintetiza siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis de ésteres tert-butílicos descrito en la página 193 a partir de 74mg de **25c** obteniéndose 37mg (0.05mmol) de **II-c** (Rto 65%).

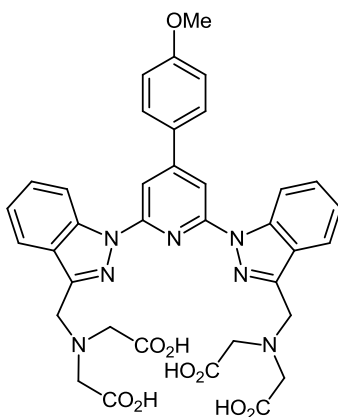


¹H-RMN (D₂O/NaOH, 300 MHz) δ: 8.44 (2H, d, *J*=4.40 Hz), 8.00 (2H, m), 7.79 (2H, m), 7.59 (2H, s), 7.32-7.11 (7H, m), 3.97(4H, s), 3.27(8H, s) ppm.

Masas FaB (M+H): 702.2407 Teórica 702.2235

Síntesis de ácido *N,N,N,N*-[2,6-bis-(3-aminometil-1-indazolil)-4-*p*-metoxifenilpiridina] tetracético (II-d).

Se sintetiza siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis de ésteres tert-butílicos descrito en la página 193 a partir de 28mg (0.04mmoles) de **II-d** (Rto 59%).

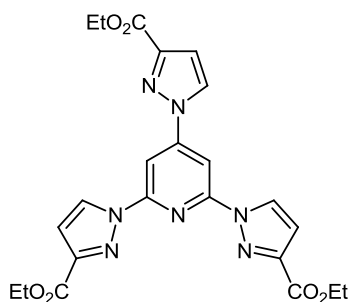


¹H-RMN (D₂O/NaOH, 300 MHz) δ: 8.38 (2H, s) 8.06 (2H, s), 7.99 (2H, s), 7.66 (2H, m), 7.52(2H, m), 7.32-7.15 (2H, m), 4.02 (3H, s), 3.96(4H, s), 3.25(8H, s) ppm.

Masas FaB (M+H-OH): 692.1 Teórica 692.2

Síntesis de la 2,4,6 tris(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)piridina (26-3).

Se disuelven 1.5 mmoles de 2,4,6 tris(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)piridina, 4.69 mmoles de 3-etoxicarbonilpirazol en 9ml de DMF. Se añade el NaH, 6mmoles, en pequeñas cantidades. Ya que produce un fuerte burbujeo. Se mantiene a 30°C durante 24 h. Tras rotar la mayor parte de DMF se consigue un aceite amarillento. Este se extrae con dicloro metano (3x15ml). Una vez secado se purifica en columna con las condiciones descritas anteriormente. Se obtiene **26-3** como un sólido blanco, 473 mgr, 64%.



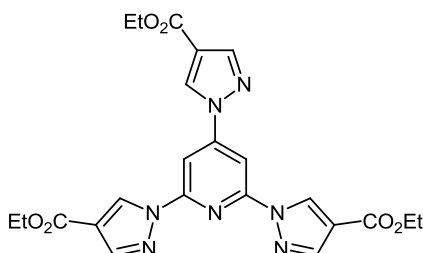
¹H-RMN (CDCl₃ 300MHz) δ: 8.58 (2H, d, *J*=2.9 Hz), 8.43 (2H, s), 8.28 (1H, d, *J*=2.9 Hz); 7.06 (1H, d, *J*= 2.9 Hz), 7.00 (2H, c, *J*=2.9 Hz), 4.47 (2H, q, *J*=7.2 Hz); 4.46 (4H, q, *J*=7.2 Hz), 1.45 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.44 (6H, t, *J*=7.2 Hz)ppm

¹³C-RMN (CDCl₃ 75MHz) δ: 161.8, 161.6, 150.9, 150.5, 147.2, 146.9, 129.1, 128.7, 111.7, 110.7, 101.0, 61.6, 61.5, 14.3 ppm

EI/MS: m/z = 494.1 (M⁺ + H⁺) 100%.

Síntesis de la 2,4,6 tris(4-etoxicarbonil-1-pirazolil)piridina (26-4)

Se disuelven 1.5 mmoles de 2,4,6 tris(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)piridina, 4.69 mmoles de 3-etoxicarbonilpirazol en 9ml de DMF. Se añade el NaH, 6mmoles, en pequeñas cantidades. Se mantiene a 30°C durante 24 h. Se elimina el disolvente obteniéndose un aceite. Se añade agua y se extrae con dicloro metano (3x15ml). Una vez secado se purifica en columna con las condiciones descritas anteriormente. Se obtiene **26-4** como un sólido blanco, 410 mgr, 61%.

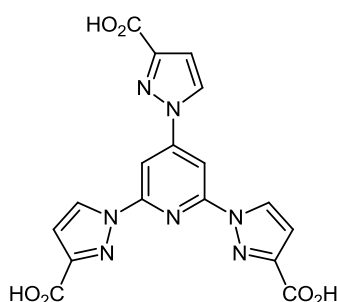


¹H-RMN (CDCl₃ 300MHz) δ: 8.99 (2H, s), 8.92 (1H, s), 8.36 (2H, d), 8.18 (1H, s), 8.15 (2H, s), 4.47 (6H, m); 1.45 (9H, m)ppm.

EI/MS: m/z = 494.1 (M⁺ + H⁺) 100%.

Síntesis del ácido 2,4,6 tris(3-carboxi-1-pirazolil)piridina 27-3

Se sintetiza siguiendo el procedimiento general para la hidrolisis de esteres etílicos descrito en la página 192, se hacen reaccionar 250mg de **26-3**, obteniéndose la sal sódica de 27-3, que tras neutralización con HCl (10%) obtenemos 183 mg de **27-3**.(Rto 90%)



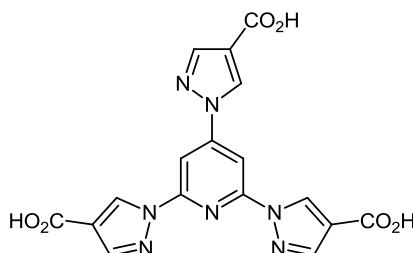
¹H-RMN (DMSO 300MHz) δ: 9.09 (2H, d, *J*=2.64 Hz), 9.04 (1H, d, *J*=2.63 Hz), 8.33 (2H, s) 7.02 (1H, d, *J*=2.64 Hz), 7.01 (2H, d, *J*=2.64 Hz) ppm.

¹³C-RMN (DMSO, 75 MHz) δ: 163.3, 162.5, 150.0, 142.7, 140.1, 139.5, 129.8, 128.6, 112.2, 110.9, 101.4 ppm.

EI/MS (MeOH+0,1%ac.formico): m/z = 432.07 (CM + Na⁺) 100%; 410.09 (CM + H⁺) 2%, 454.05 (CM + 2Na⁺) 6%.

Síntesis del ácido 2,4,6 tris(4-carboxi-1-pirazolil)piridina 27-4

Se sintetiza siguiendo el procedimiento general para la hidrolisis de esteres etílicos descrito en la página 192, se hacen reaccionar 250mg de **26-4**, obteniéndose 196 mg de **27-4**.(Rto 96%)



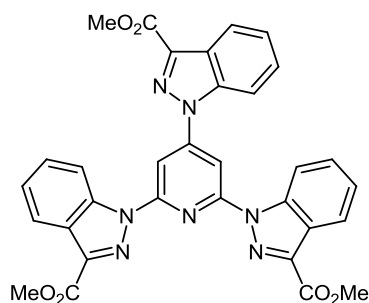
^1H -RMN (DMSO, 300MHz) δ : 9.65 (2H, s); 9.54 (1H, s); 8.46 (2H, s); 8.24 (1H, s); 8.22 (2H, s).

^{13}C -RMN (DMSO, 75 MHz) δ : 162.9, 163.0, 151.0, 147.5, 144.4, 141.9, 132.0, 130.9, 111.1, 110.2, 101.2 ppm.

EI/MS (MeOH): m/z = 432.1 (CM + Na^+) 100%

Síntesis del ácido 2,4,6 tris(3-metoxycarbonil-1-indazolil)piridina (**29**)

En un matraz Schlenck se disuelve 3 metoxycarbonilindazol (3.2mmol) 4-Bromo-2,6-difluoropiridina (200mg) en dimetilformamida, bajo atmosfera inerte a 0°C. Se adiciona hidruro sódico (2.2 mmol) y se calienta la reacción a 40°C durante 3 horas. Se añade agua a la mezcla y se decanta la fase acuosa. El solido se seca a vacio y se obtienen 430mg de **29** (67%) .

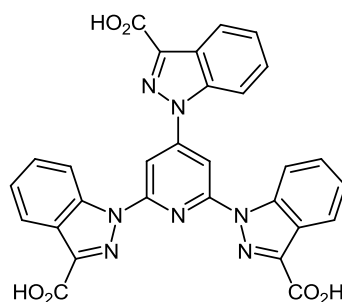


^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.70 (2H, d, $J=8.55$ Hz), 8.54 (2H, s), 8.36 (1H, d, $J=8.11$ Hz), 8.33 (2H, d, $J=7.89$ Hz), 8.13 (1H, d, $J=8.55$ Hz), 7.66 (1H, t, $J=8.11$ Hz) 7.55 (2H, t, $J=8.22$ Hz), 7.52-7.43 (3H, m), 4.11 (9H, s) ppm.

FB+($\text{M}+\text{H}^+$)=602.1 (100%)

Síntesis del ácido 2,4,6 tris(3-carboxi-1-indazolil)piridina (**30**)

Se sintetiza siguiendo el procedimiento general para la hidrolisis de esterés etílicos descrito en la página 192, se hacen reaccionar 500mg de **29**, obteniéndose 380 mg de **30**.(Rto 80%).



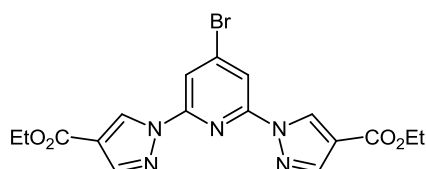
^1H -RMN (DMSO-TFA, 300 MHz) δ : 8.70 (2H, d, J = 8.67 Hz), 8.44 (2H, s), 8.30 (2H, d, J =8.09 Hz), 8.26 (1H, d, J = 9.02 Hz), 8.06 (1H, d, J =8.67 Hz), 7.69-7.61 (3H, m), 7.55-7.50 (3H, m) ppm.

Análisis Elemental: exp %C: 47,52 %H: 3,33 %N: 13,07

Teorico: %C: 47.48, %H: 3.53, %N 3.37

Síntesis del 4-Bromo-2,6-bis(4-etoxicarbonil-1-pirazolil)piridina (2-4)

Se disuelve el 4-etoxicarbonilpirazol (2.1 mmol) y 4-Bromo-2,6-difloropiridina (195mg, 1mmol) en THF (15 mL), en atmosfera inerte. Se enfría a 0°C y se le añade adición hidruro sódico (2.2 mmol). Se agita durante 4 horas. Transcurrida la reacción, se elimina el disolvente, se lava con agua y se extrae con diclorometano. La fase orgánica se seca y se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM:Hexano 1:1). Se obtienen 398mg de **2-4** (Rto 90%).

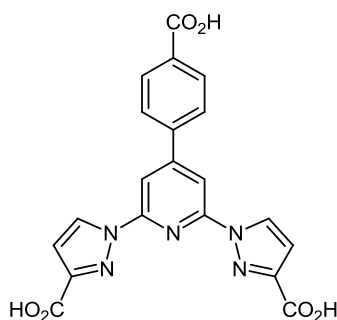


^1H -RMN (CDCl_3 300MHz) δ : 9.01 ppm (2H, s), 8.16 (2H, s), 8.15 (2H, s), 4.40 (4H, c, J = 7.13 Hz), 1.43 (6H, t, J =7.13 Hz) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 75MHz) δ : 162.5, 149.8, 143.7, 137.4, 130.4, 117.9, 114.3, 60.9, 14.4 ppm.

Síntesis del ácido 2,6-bis(3-carboxi-1-pirazolil)-4-(carboxifenil)piridina (31-3).

Se sintetiza según el método general descrito en la página 193 para reacciones de acoplamiento de Suzuki e hidrólisis simultaneas, se hacen reaccionar 1.6mmoles de **2-3**, obteniéndose 370mgr del producto **31-3**; 54%.



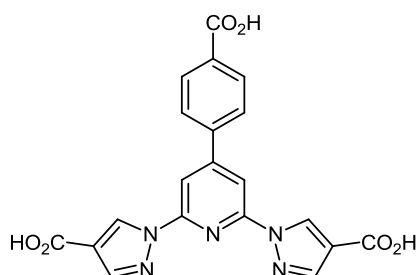
^1H -RMN (DMSO, 300MHz) δ : 9.15(4H, s); 8.32 (4H, s), 8.22 (4H, d, $J=9.7$ Hz), 8.03 (4H, s) ppm.

^{13}C -RMN (DMSO 75MHz) δ : 165.6, 163.9, 151.4, 145.3, 143.5, 142.1, 132.3 132.0, 130.4, 129.2, 119.1, 110.10 ppm.

EI/MS (DMSO/MeOH: m/z = 418.1 (CM – H) $^-$

Síntesis del ácido 2,6-bis(4-carboxi-1-pirazolil)-4-(carboxifenil)piridina (31-4).

Se sintetiza según el método general descrito en la página 193 para reacciones de acoplamiento de Suzuki e hidrólisis simultaneas, se hacen reaccionar 1.6mmoles de **2-4pz** obteniéndose 365mg de **31-4pz** (52%).



^1H -RMN (DMSO 300MHz) δ : 9.03 (2H, d, $J=2.63$ Hz), 8.10-8.07 (3H, m), 7.99 (2H, d, $J=8.33$ Hz), 6.99 (2H, d, $J=2.63$ Hz)ppm.

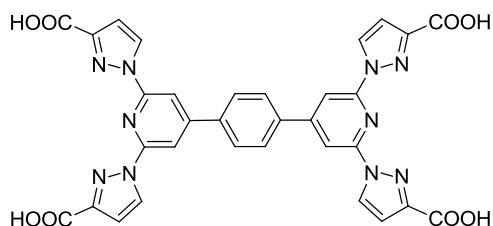
^{13}C -RMN (DMSO 75MHz) δ : 165.4, 163.9, 149.43 143.8, 143.5, 142.6, 132.3, 132.0, 130.7, 118.3, 118.2, 111.1 ppm.

EI/MS (DMSO/MeOH: m/z = 418.1 (CM – H) $^-$

Síntesis del 1,4-bis(3-carboxi-1-Pirazolil)piridin)benzeno (32-3)

Se sintetiza según el método general descrito para reacciones de microondas, a partir de la 4-Bromo-2,6-bis(3-etoxicarbonil-1H-pirazolil)piridina (1.03 mmoles), el ácido fenil diborano (0.51 mmoles), el tetrakis(trifenilfosfina) paladio (0.05 mmoles) y el hidróxido

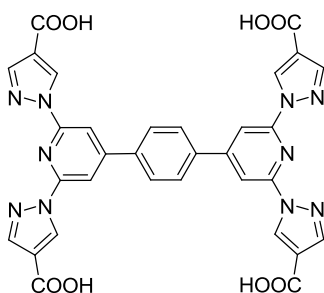
potásico 1M (2.27 ml). Aislado un sólido, según el proceso mencionado anteriormente. Se consigue un sólido grisáceo 410 mgr; 59%.



¹H-RMN (DMSO-TFA, 300MHz) δ : 9.13 (4H, d, $J=2.64$ Hz), 7.97 (4H, d, $J=8.29$ Hz), 7.73 (4H, s), 7.04 (4H, d, $J= 2.64$ Hz).

Síntesis del 1,4-bis(4-carboxi-1H-Pirazol-1-il)piridin)benceno (32-4)

Se sintetiza según el método general descrito en la página 192 para reacciones de Suzuki con hidrolisis simultanea, a partir de la **2-4pz** (430mg, 1mmol), y medio equivalente del ácido fenildiboronico (0.49 mmoles), ya que se produce una suzuki doble, se obtienen 365mgr de 54%.

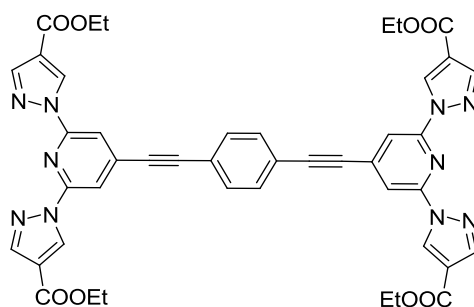


¹H-RMN (DMSO-TFA, 300MHz) δ : 9.15(s, 4H); 8.32 (s, 4H); 8.22 (d, $J= 9.7$ Hz, 4H); 8.03 (s, 4H).

Síntesis del 1,4 (2',2'',6',6''-bis(3-etoxicarbonil-1H-Pirazol-1-il)piridin-4',4''-etinil)

Benceno (33-4).

Siguiendo el procedimiento para las reacciones de sonogashira en microondas descrito en la página 192, se hace reaccionar 650 mg (1.5mmol) de **2-3** y la mitda de equivalentes de 1,4-dietinilbenceno. Obteniendose 750 mgr de **33-4** (60%).

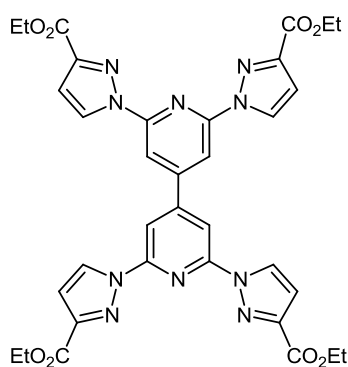


^1H -RMN (CDCl_3 300MHz): δ = 8.98 (4H, s), 8.11 (4H, s), 8.02 (4H, s), 8.56-8.52 (4H, m, J =8.36 Hz), 4.37 (8H, c, J =6.97 Hz), 1.40 (12H, t, J =6.97 Hz)ppm.

EI/MS (Ditranol): m/z = 833.3 (CM + H^+).

Síntesis de 2,2',6,6'-bis-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-4,4'-bipiridina 34

Se prepara una disolución de cloruro de Niquel hexahidratado (200mg,0.8mmol) y trifenilfosfina (900mg) en 3 mL de DMF bajo atmósfera de argón. La disolución se calienta a 50°C y se añade 60mg de Zinc. Tras una hora de reacción se añade el reactivo **2-3pz** (390mg) disuelto en 4 mL de DMF. A las 24 horas se trata la reacción con NH_4OH (15%, 25mL) y se extrae con diclorometano. El residuo se purifica en columna de cromatografía de gel de sílice (CH_2Cl_2 :MeOH 1%), obteniéndose 34 como un sólido blanco (95mg, 14%)



^1H -RMN (CDCl_3 300MHz) δ : 8.65 (4H, d, J =2.41 Hz) , 8.40 (4H, s), 7.06 (4H, d, J =2.43 Hz), 4.35 (8H, c, J =7.14 Hz), 1.43 (12H, t, J =7.21 Hz)ppm.

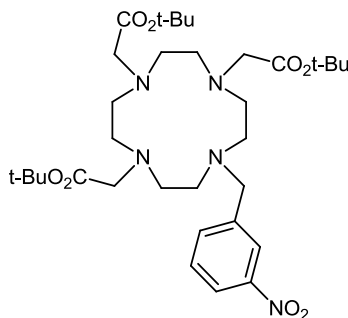
^{13}C -RMN (CDCl_3 75MHz) δ : 161.4, 151.1, 147.7, 143.5, 128.9, 118.1, 109.7, 60.5, 14.2 ppm.

MALDI (Ditranol): $[\text{M}+\text{Na}]^+=731.2$ (100%)

Síntesis de los quelatos portadores de iones (ICC)

Síntesis del triacetato 2,2',2''-(10-(3-nitrobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) de tri-tert-butilo (i)

DO3AtBu (0.4 g, 0.78 mmol) y el bromuro de 3-nitrobencilo (0.17 g, 0.78 mmol) se disuelven en acetonitrilo seco (40 mL) y bajo atmósfera de argón. Se añade carbonato potásico anhidro (0.5 g, 3.8 mmol) a la disolución. La reacción se agita a 55°C durante 3.5 horas. La mezcla se filtra y el filtrado es evaporado. El residuo se purifica mediante cromatografía en sílice (diclorometano y metanol al 5%). Se obtiene **(i)** (0.37 g, 73 %).



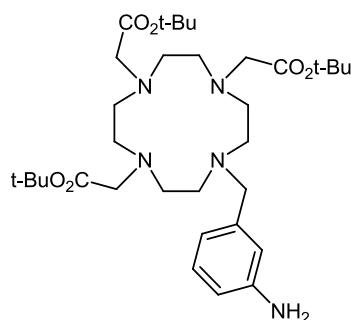
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.68 (1H, t, J= 2.1 Hz), 8.13 (1H, ddd, J=1 Hz, 2.1 Hz, 8.1 Hz), 7.76 (1H, dt, J= 1 Hz, 8.1 Hz), 7.53 (1H, t, J= 8.1 Hz), 3.64-2.18 (24H, m), 1.46 (9H, s), 1.42 (9H, s) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 173.65; 172.68; 148.74; 140.03; 137.17; 129.45; 124.81; 122.54; 83.08; 82.50; 59.02; 56.08; 55.77; 51.65; 50.24; 28.12; 27.88 ppm.

E.M. (MALDI⁺): m/z= 651 ([M]⁺, 100%).

Síntesis del triacetato 2,2',2''-(10-(3-aminobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) de tri-tert-butilo (ii)

Borohidruro sódico (30 mg, 0.80 mmol) se añade en pequeñas porciones a una mezcla del compuesto **(i)** (0.35 g, 0.53 mmol), Pd/C 10% (35 mg) y metanol seco (10 mL). Después de agitar toda la noche a temperatura ambiente, la mezcla se filtra sobre celita, se neutraliza con HCl al 5%, se diluye con diclorometano, se lava con una disolución saturada de bicarbonato sódico y se seca con sulfato sódico. El producto se purifica mediante cromatografía en sílice (diclorometano, metanol 5% y trietilamina 1%). Se obtiene **(ii)** (0.2 g, 62 %).



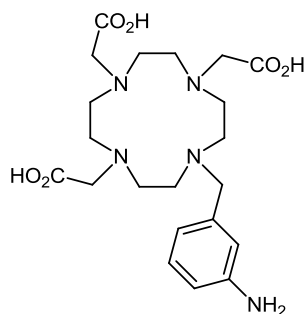
^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.05 (1H, t, J = 7.8 Hz), 6.83 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.77 (1H, t, J = 1.7 Hz), 6.60 (1H, dd, J = 1.7 Hz, 7.8 Hz), 3.95-2.21 (24H, m), 1.48 (18H, s), 1.47 (9H, s) ppm.

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 173.30, 172.40; 147.08; 138.48; 129.65; 118.94; 117.22; 114.08; 82.84; 82.40; 59.76; 55.99, 55.71, 28.0, 27.87.

E.M. (MALDI $^+$): m/z = 621 ($[\text{M}]^+$, 100%).

Síntesis del ácido 2,2',2''-(10-(3-aminobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) triacético (iii)

El compuesto (ii) (90 mg, 0.15 mmol) se disuelve en ácido trifluoroacético (0.6 mL) y se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de su evaporación, la mezcla se tritura con éter etílico (4 mL) y se centrifuga. El producto (iii) (66 mg, 55 %) se usa directamente en la siguiente etapa.



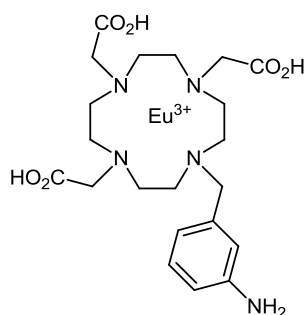
^1H -RMN (D_2O , 300 MHz) δ : 7.66 (1H, s); 7.50 (2H, m); 7.36 (1H, d, J = 6 Hz), 3.87-2.91 (24H, m) ppm.

^{13}C -RMN (D_2O , 300 MHz) δ : 166.1; 165.8; 134.07; 133.49; 133.44; 127.94; 120.48; 118.16; 59.51; 58.21; 56.78; 54.43; 53.38 ppm.

E.M. (MALDI $^+$): m/z = 453 ($[\text{M}]^+$, 100%).

Síntesis del 2,2',2''-(10-(3-aminobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) triacetato de europio (III) (iv-Eu)

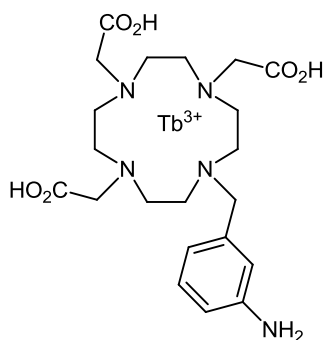
El compuesto **(iii)** (30 mg, 38 μmol) se disuelve en agua (525 μL) y el pH se ajusta a 6.5 con carbonato sódico sólido. $\text{EuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20 mg, 55 μmol) se disuelve en agua (375 μL) y se añade sobre la disolución anterior, manteniendo el pH 5-7. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 3.5 horas, y el pH se ajusta a 8.5 con NaOH 1M; entonces, el precipitado se centrifuga, se tritura y se lava varias veces con acetona. Se obtiene **(iv-Eu)** (21 mg, 89 %).



E.M. (MALDI⁺): $m/z = 603$ ($[\text{M}]^+$, 100%).

Síntesis del 2,2',2''-(10-(3-aminobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) triacetato de terbio (III) (iv-Tb)

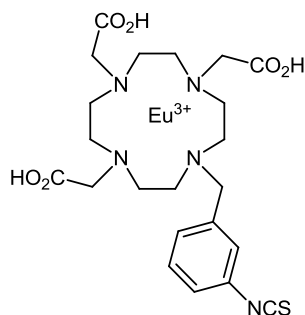
El compuesto **(iii)** (30 mg, 38 μmol) se disuelve en agua (525 μL) y el pH se ajusta a 6.5 con carbonato sódico sólido. $\text{TbCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20 mg, 55 μmol) se disuelve en agua (375 μL) y se añade sobre la disolución anterior, manteniendo el pH 5-7. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 3.5 horas, y el pH se ajusta a 8.5 con NaOH 1M; entonces, el precipitado se centrifuga, se tritura y se lava varias veces con acetona. Se obtiene **(iv-Tb)** (21 mg, 89 %).



MS (ElectroSpray): 609.1501.

Síntesis del 2,2',2''-(10-(3-isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) triacetato de europio (III) (v-Eu)

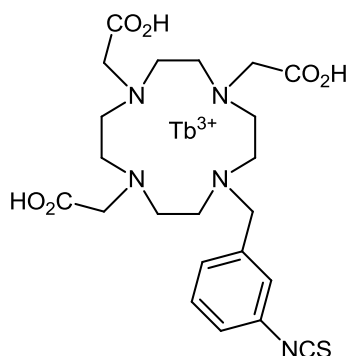
Una disolución acuosa (250 μL) del compuesto **(iv-Eu)** (19 mg, 29 μmol), se añade lentamente sobre una mezcla de tiofosgeno (15 μL , 197 μmol), bicarbonato sódico (24 mg, 286 μmol) y cloroformo (250 μL). Después de 1.5 horas de agitación, la fase acuosa se lava con cloroformo, el pH se ajusta a 7 con HCl 1M y el producto precipita con acetona. El precipitado **(v-Eu)** se aísla por centrifugación y se lava dos veces con acetona.



E.M. (MALDI⁺): $m/z = 643$ ($[\text{M}]^+$, 100%).

Síntesis del 2,2',2''-(10-(3-isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) triacetato de terbio (III) (v-Tb).

Una disolución acuosa (250 μL) del compuesto **(iv-Tb)** (20 mg, 29 μmol), se añade lentamente sobre una mezcla de tiofosgeno (15 μL , 197 μmol), bicarbonato sódico (24 mg, 286 μmol) y cloroformo (250 μL). Después de 1.5 horas de agitación, la fase acuosa se lava con cloroformo, el pH se ajusta a 7 con HCl 1M y el producto precipita con acetona. El precipitado **(v-Tb)** se aísla por centrifugación y se lava dos veces con acetona.



E.M. (MALDI⁺): $m/z = 672.5$ ($[\text{M}] + \text{Na}^+$, 100%)

7.5. Reacciones de conjugación e hibridación

Anclaje del Quelato Portador de Iones (ICC) al oligonucleótido

Como paso previo a la reacción de anclaje del ICC al oligonucleótido es necesario valorar el contenido en europio de la sonda ICC, para ello se disuelven 2mg del ICC en 50 μ L de agua esterilizada. Se coge 1 μ L de la disolución anterior y se añaden 49 μ L de ácido clorhídrico 5M, Esta nueva disolución se incuba durante 30 minutos a 37°C.

Después de su incubación se hacen diversas diluciones con DES (Delfia Enhancement Solution) para determinar la concentración de Eu en el ICC mediante el estudio de la emisión de fosforescencia usando como estándar Eu (1nM) disuelto en DES.

Una vez determinada su concentración se hace la reacción de anclaje. Para llevar a cabo dicha reacción se incuban a 37°C toda la noche el oligonucleótido (5 nmoles) y el ICC (10 nmoles) en tampón carbonato (2,5 μ L) y agua esterilizada hasta tener un volumen final de 25 μ L.

La reacción de anclaje se purifica mediante HPLC previa filtración mediante una columna NAP-5 y usando como eluyente tampón de almacenamiento.

Una vez obtenidas las diferentes fracciones se determina el grado de marcaje (relación entre la concentración de oligonucleótido y de Europio). Para ello se calcula la concentración de Europio en el oligonucleótido marcado mediante su espectro de emisión mediante el uso de la disolución certificada de Europio 1 nM, y la concentración de oligonucleótido mediante el espectro de ultravioleta.

Anclaje del Ligando Antena (AL) al oligonucleótido

Se disuelven 2,5mg de AL en 150 μ L de N,N'-dimetilformamida. Se incuban a 50°C toda la noche el ligando antena (500nmol) y el oligonucleótido (5nmoles) en tampón carbonato (2,5 μ L) y agua esterilizada hasta un volumen final de

25 μ L.

La reacción de anclaje se purifica mediante HPLC previa filtración mediante una columna NAP-5 usando como eluyente tampón de almacenamiento.

La concentración de producto anclado se determina mediante su espectro de ultravioleta.

Ensayo de hibridación

Se prepara la disolución que contiene al AL y al ICC anclados al oligonucleótido. Para ello se pipetea el volumen correspondiente para tener $0.05\mu\text{M}$ de ICC, $0.05\mu\text{M}$ de AL (concentración final en la disolución $0.1\mu\text{L}$ entre el ICC y el AL) y se completa con tampón de hibridación hasta un volumen final de $400\mu\text{L}$, que es lo que aparece en la tabla como disolución de sondas AL e ICC.

Síntesis de los MOFS

En un autoclave como el mostrado en la Figura 7.1 se mezcla el ligando que elegido como unidad estructural (1 mmol) y el cloruro del lantánido hexahidratado (0.5 mmol). Se disuelven en agua, y se ajusta el pH a 7, utilizando NaOH (1M). La mezcla en el autoclave se calienta en una estufa a 120°C , durante 12 o 72h.

El sólido resultante se filtra y se lava repetidas veces con agua y acetona, obteniéndose el material deseado.



Figura 7.1. Autoclave utilizado en la síntesis hidrotermal.